

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela profesional de Ingeniería Biotecnológica



“EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA DE MATERIA FECAL SIMULADA UTILIZANDO *Lactobacillus casei*”

Tesis presentada por la Bachiller:
Medina Chávez, Yohiss del Rocío

Para optar el Título Profesional de
Ingeniera Biotecnóloga

Asesor de tesis:
**PhD. Villanueva Salas, José
Antonio**

Arequipa – Perú

2023

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 24 de Enero del 2023

Dictamen: 006237-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 006237, presentado por:

2014101182 - MEDINA CHAVEZ YOHISS DEL ROCIO

Titulado:

**"EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA DE MATERIA FECAL SIMULADA
UTILIZANDO LACTOBACILLUS CASEI"**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29440909 - MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS
DICTAMINADOR**



**42098888 - CORDOVA BARRIOS CINTHIA CAROL
DICTAMINADOR**



**29630612 - TERAN DIANDERAS ADILMI MILAGRO
DICTAMINADOR**



EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA DE MATERIA FECAL SIMULADA UTILIZANDO *Lactobacillus casei*

INFORME DE ORIGINALIDAD

21%

INDICE DE SIMILITUD

20%

FUENTES DE INTERNET

13%

PUBLICACIONES

13%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1%
2	nmbu.brage.unit.no Fuente de Internet	1%
3	www.degruyter.com Fuente de Internet	<1%
4	www.tuhh.de Fuente de Internet	<1%
5	agronfoodacademy.com Fuente de Internet	<1%
6	revistas.unal.edu.co Fuente de Internet	<1%
7	www.dora.lib4ri.ch Fuente de Internet	<1%
8	mdpi-res.com Fuente de Internet	<1%

9	pure.fujita-hu.ac.jp Fuente de Internet	<1 %
10	Submitted to Universidad Cooperativa de Colombia Trabajo del estudiante	<1 %
11	cienciadigital.org Fuente de Internet	<1 %
12	es.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
13	REGIANE ALVES DE OLIVEIRA, Carlos Eduardo Vaz Rossell, Bêtanía Hoss Lunelli, Pedro Otávio Marques Schichi et al. "Different Strategies to Improve Lactic Acid Productivity based on Microorganism Physiology and Optimum Operating Conditions", Industrial & Engineering Chemistry Research, 2018 Publicación	<1 %
14	appswl.elsevier.es Fuente de Internet	<1 %
15	ouci.dntb.gov.ua Fuente de Internet	<1 %
16	Submitted to University of Malawi - The Polytechnic Trabajo del estudiante	<1 %
17	storage.googleapis.com Fuente de Internet	<1 %

18

repositoriotec.tec.ac.cr

Fuente de Internet

<1 %

19

Yuqian Xu, Xiangyuan Wen, Dequan Zhang, Martine Schroyen, Debao Wang, Xin Li, Chengli Hou. "Changes in the Freshness and Bacterial Community of Fresh Pork in Controlled Freezing Point Storage Assisted by Different Electrostatic Field Usage Frequencies", Food and Bioprocess Technology, 2023

Publicación

<1 %

20

Laura Cantisano de Deus Silva, Priscila Monaro Bianchini, Erika Veruska Paiva Ortolan, Juliana Fattori Hamamoto et al. "Brazilian Portuguese version of the Amsterdam infant stool scale: a valid and reliable scale for evaluation of stool from children up to 120 days old", BMC Pediatrics, 2021

Publicación

<1 %

21

Nienke Andriessen, Eugene Appiah-Effah, Shirley Josephine Iyamide Browne, Rita al Jahjah et al. "Quantities and qualities of fecal sludge: Experiences from field implementation with a Volaser in 7 countries during a pandemic", Frontiers in Water, 2023

Publicación

<1 %

22

Fuente de Internet

<1 %

23

qdoc.tips

Fuente de Internet

<1 %

24

www.bvs.hn

Fuente de Internet

<1 %

25

www.labome.org

Fuente de Internet

<1 %

26

www.wjgnet.com

Fuente de Internet

<1 %

27

xavierpicolozano.files.wordpress.com

Fuente de Internet

<1 %

28

Submitted to Embry Riddle Aeronautical University

Trabajo del estudiante

<1 %

29

Submitted to University of Johannesburg

Trabajo del estudiante

<1 %

30

pubs.acs.org

Fuente de Internet

<1 %

31

cancerres.unboundmedicine.com

Fuente de Internet

<1 %

32

tigerprints.clemson.edu

Fuente de Internet

<1 %

33

www.mif-ua.com

Fuente de Internet

<1 %

34

repositorio.una.edu.ni

Fuente de Internet

<1 %

35

scielosp.org

Fuente de Internet

<1 %

36

www.slideshare.net

Fuente de Internet

<1 %

37

Submitted to University of Auckland

Trabajo del estudiante

<1 %

38

ir.ymlib.yonsei.ac.kr

Fuente de Internet

<1 %

39

link.springer.com

Fuente de Internet

<1 %

40

repositorio.unifesp.br

Fuente de Internet

<1 %

41

Submitted to Texas Woman's University

Trabajo del estudiante

<1 %

42

Cecilia Lalander, Åke Nordberg, Björn Vinnerås. "A comparison in product-value potential in four treatment strategies for food waste and faeces - assessing composting, fly larvae composting and anaerobic digestion", GCB Bioenergy, 2018

Publicación

<1 %

43	docplayer.es Fuente de Internet	<1 %
44	opus.lib.uts.edu.au Fuente de Internet	<1 %
45	www.researchsquare.com Fuente de Internet	<1 %
46	Wakana Oishi, Björn Vinnerås, Daisuke Sano. "Resource recovery technologies as microbial risk barriers: towards safe use of excreta in agriculture based on hazard analysis and critical control point", Environmental Science: Water Research & Technology, 2023 Publicación	<1 %
47	www.tdx.cat Fuente de Internet	<1 %
48	Submitted to Loughborough University Trabajo del estudiante	<1 %
49	dspace.aepro.com Fuente de Internet	<1 %
50	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
51	www.metarevistas.org Fuente de Internet	<1 %
52	Submitted to University of Wisconsin, La Crosse	<1 %

53

authors.library.caltech.edu

Fuente de Internet

<1 %

54

generalchemistry.chemeng.ntua.gr

Fuente de Internet

<1 %

55

pubmed.ncbi.nlm.nih.gov

Fuente de Internet

<1 %

56

"Chemical Technologies and Processes",
Walter de Gruyter GmbH, 2020

Publicación

<1 %

57

Lemnaro Jamir, Vikas Kumar, Jasleen Kaur,
Satish Kumar, Harminder Singh.
"Composition, valorization and therapeutical
potential of molasses: a critical review",
Environmental Technology Reviews, 2021

Publicación

<1 %

58

journals.rcni.com

Fuente de Internet

<1 %

59

Guillermo Eduardo Sedó Molina,
Radhakrishna Shetty, Hang Xiao, Anders
Peter Wätjen et al. "Development of a novel
lactic acid bacteria starter culture approach:
From insect microbiome to plant-based
fermentations", LWT, 2022

Publicación

<1 %

60

etd.aau.edu.et

Fuente de Internet

<1 %

61

tel.archives-ouvertes.fr

Fuente de Internet

<1 %

62

Nataliya Loiko, Oleg Kanunnikov, Yuriy Litti.
"Use of *Alcaligenes faecalis* to Reduce
Coliforms and Enhance the Stabilization of
Faecal Sludge", *Sustainability*, 2023

Publicación

<1 %

63

Submitted to Universidad Internacional Isabel
I de Castilla

Trabajo del estudiante

<1 %

64

experts.umn.edu

Fuente de Internet

<1 %

65

livrosdeamor.com.br

Fuente de Internet

<1 %

66

pingpdf.com

Fuente de Internet

<1 %

67

repository.unilivre.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

68

www.scribd.com

Fuente de Internet

<1 %

69

1library.co

Fuente de Internet

<1 %

gatesopenresearch.org

70

Fuente de Internet

<1 %

71

repositorio.ucsm.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

72

repository.uamerica.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

73

dspace.unitru.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

74

repositorio.uti.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

75

wjgnet.com

Fuente de Internet

<1 %

76

repositorio.espe.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

77

ri.conicet.gov.ar

Fuente de Internet

<1 %

78

ri.ues.edu.sv

Fuente de Internet

<1 %

79

tesis.ucsm.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

80

www.pseau.org

Fuente de Internet

<1 %

81

Submitted to Universidad de las Islas Baleares

Trabajo del estudiante

<1 %

82	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
83	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	<1 %
84	hostinguate.com Fuente de Internet	<1 %
85	vdocuments.es Fuente de Internet	<1 %
86	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 %
87	www.uv.mx Fuente de Internet	<1 %
88	repositorio.puce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
89	repositorio.unprg.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
90	Cabot, Pere-Lluis, Juan Casado, and Enric Brillas. "Electrochemical Methods for Degradation of Organic Pollutants in Aqueous Media", Environmental Science & Pollution, 2003. Publicación	<1 %
91	Fanqiang Meng, Mingwen Zhao, Zhaoxin Lu. "The LuxS/AI-2 system regulates the probiotic	<1 %

activities of lactic acid bacteria", Trends in Food Science & Technology, 2022

Publicación

92	pdfcookie.com Fuente de Internet	<1 %
93	repositorio.utc.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
94	www.yumpu.com Fuente de Internet	<1 %
95	Submitted to Universidad Europea de Madrid Trabajo del estudiante	<1 %
96	Submitted to Universidad de San Buenaventura Trabajo del estudiante	<1 %
97	livros01.livrosgratis.com.br Fuente de Internet	<1 %
98	portusonline.org Fuente de Internet	<1 %
99	www.scielo.org.co Fuente de Internet	<1 %
100	dieteticaynutricionweb.wordpress.com Fuente de Internet	<1 %
101	es.scribd.com Fuente de Internet	<1 %

www.polodelconocimiento.com

102	Fuente de Internet	<1 %
103	Submitted to Pontificia Universidad Catolica Madre y Maestra PUCMM Trabajo del estudiante	<1 %
104	core.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
105	doczz.com.br Fuente de Internet	<1 %
106	es.wikipedia.org Fuente de Internet	<1 %
107	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	<1 %
108	LILIANA CANO GARCÍA. "Selección de levaduras de debaryomyces hansenii y determinación de su efecto en la calidad aromática de los embutidos crudos curados", Universitat Politecnica de Valencia, 2014 Publicación	<1 %
109	aprenderly.com Fuente de Internet	<1 %
110	cdn.www.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
111	diabetesdietinfo.org Fuente de Internet	<1 %

112	fr.readkong.com Fuente de Internet	<1 %
113	repositorio.uam.es Fuente de Internet	<1 %
114	repositorio.unifei.edu.br Fuente de Internet	<1 %
115	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
116	www.doccity.com Fuente de Internet	<1 %
117	www.elsevier.es Fuente de Internet	<1 %
118	Carlos Alberto Martins Cordeiro, Evaldo Martins da Silva, Norma Suely Evangelista-Barreto. "Ciência e Tecnologia de Alimentos: pesquisa e práticas contemporâneas - Volume 2", Editora Científica Digital, 2021 Publicación	<1 %
119	M. Laurencio. "ACTIVIDAD PROBIOTICA DE UNA MEZCLA DE EXCLUSION COMPETITIVA EN INDICADORES MICROBIOLOGICOS EN POLLOS DE CEBA PREBIOTIC AND PROBIOTIC ACTIVITY OF AN ENZYMATIC HYDROLYSED OF ALCOHOL DISTILLERY CREAM IN BROILERS ACTIVIDADE PROBIOTICA DUNHA MISTURA DE EXCLUSION COMPETITIVA NOS	<1 %

INDICADORES MICROBIOLOGICOS EN POLOS DE CEBA", CyTA - Journal of Food, 12/01/2005

Publicación

120 Sneh Punia Bangar, Shweta Suri, Monica Trif, Fatih Ozogul. "Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach", Food Bioscience, 2022 $<1\%$

Publicación

121 Submitted to Universidad de Burgos UBUCEV $<1\%$

Trabajo del estudiante

122 apirepositorio.unh.edu.pe $<1\%$

Fuente de Internet

123 bdigital.unal.edu.co $<1\%$

Fuente de Internet

124 doku.pub $<1\%$

Fuente de Internet

125 patents.google.com $<1\%$

Fuente de Internet

126 repositorio.upct.es $<1\%$

Fuente de Internet

127 repositorio.utn.edu.ec $<1\%$

Fuente de Internet

128 www.medioambiente.gov.ar $<1\%$

Fuente de Internet

129 www.redalyc.org

Fuente de Internet

<1 %

130

www.utp.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

131

Norman Sigui. "¿Por qué continúa la contaminación de aguas en Guatemala?", Ciencia, Tecnología y Salud, 2016

Publicación

<1 %

132

Susan Michelz Beitel, Daiane Cristina Sass, Luciana Fontes Coelho, Jonas Contiero. "High D(-) lactic acid levels production by Sporolactobacillus nakayamae and an efficient purification", Annals of Microbiology, 2016

Publicación

<1 %

133

idoc.pub

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias Apagado

Excluir bibliografía

Apagado

DEDICATORIA

A Dios, mi guía celestial.

A mi madre, mi ángel eterno y mi inspiración.

*A mi padre quien es mi apoyo incondicional,
mi ejemplo de lucha diaria y superación.*



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme salud, sabiduría y bendiciones que me dio en este camino.

Al proyecto PNIPA- PES-SIADE-PP-000260 que contribuyó al desarrollo de la investigación.

Al Laboratorio de Agua y Medio Ambiente perteneciente al área de Investigación de la Universidad Tecnológica del Perú filial Arequipa por el apoyo brindado para el presente estudio.

A José A. Villanueva Salas PhD por su apoyo durante la elaboración de este trabajo de investigación.

A D.Sc. Stamber Alvaro Ramírez Revilla por su valioso tiempo, paciencia, apoyo y enseñanzas brindadas durante la elaboración de investigación.

A mis compañeros de Laboratorio de Agua y Medio Ambiente, por su ayuda

A mi abuela por estar siempre conmigo.

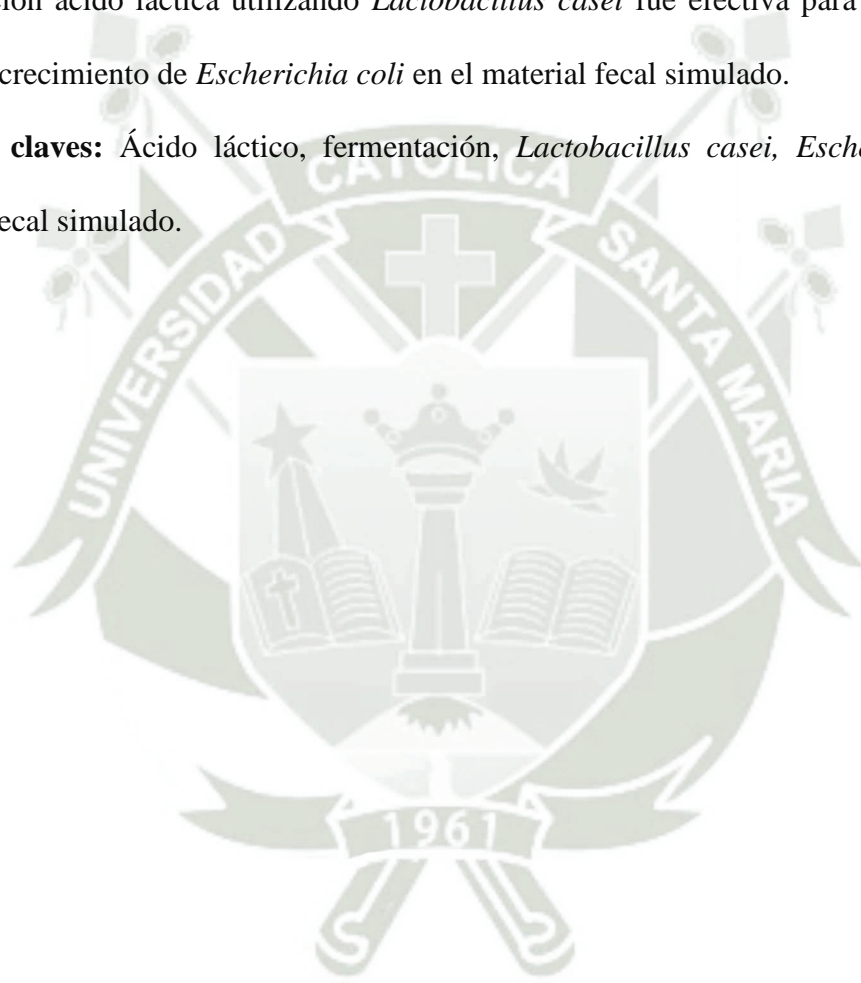


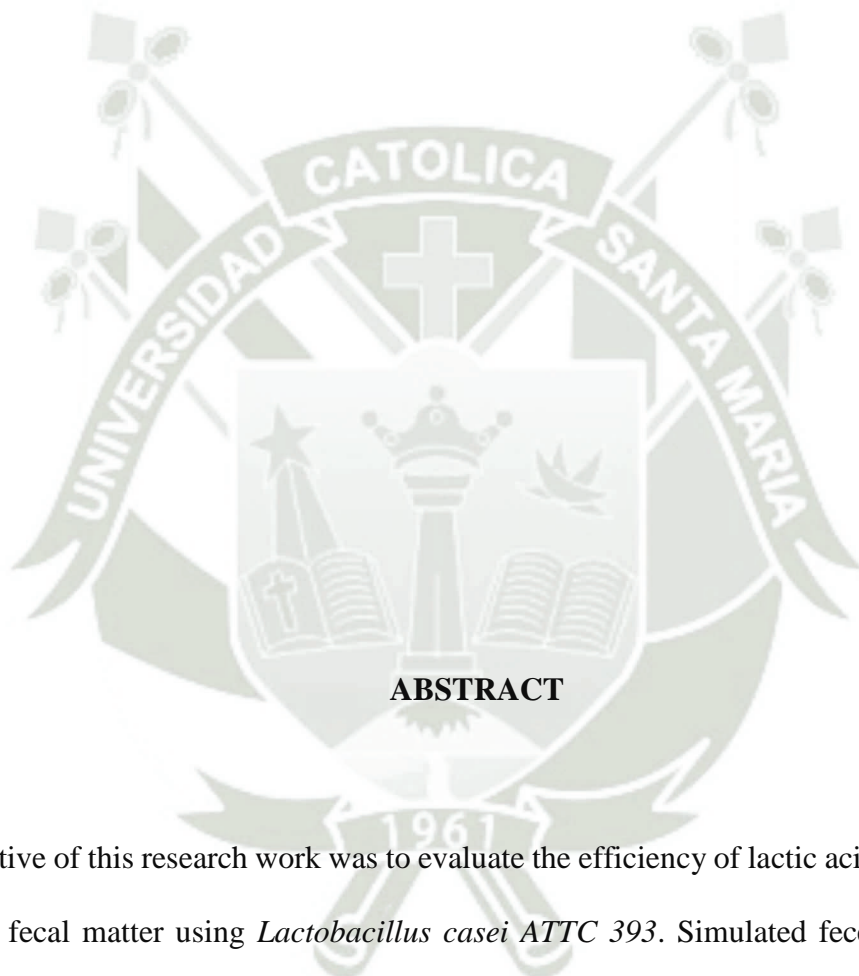
RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la fermentación ácido láctica en materia fecal simulada utilizando *Lactobacillus casei* ATTC 393. Se elaboraron heces fecales simuladas de acuerdo con las formulaciones revisadas, las cuales fueron adaptadas a condiciones de laboratorio. Se utilizó un grupo control y tres grupos de estudio, cada uno compuesto con material fecal simulado inoculado con *Escherichia coli* ATTC 25922, melaza al 15% y *Lactobacillus casei* al 0, 5, 10 y 20% respectivamente. Se realizó la fermentación ácido láctica durante 10 días, se evaluó el pH, el porcentaje de acidez (ácido láctico diariamente y el crecimiento de *Escherichia coli* y *Lactobacillus casei* cada 3 días.

Los resultados demostraron que el pH disminuyó, la producción de ácido láctico fue mayor al 3% y el crecimiento de *Escherichia coli* fue inhibido totalmente a partir del día 5. Se observó que entre el grupo 2 (*Lactobacillus casei* al 10%) y el grupo 3 (*Lactobacillus casei* al 20%) la producción de ácido láctico no tuvo diferencia significativa, mientras que el grupo 1 (*Lactobacillus casei* al 5%) tuvo una menor producción de este. Se concluye que la fermentación ácido láctica utilizando *Lactobacillus casei* fue efectiva para producir ácido e inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* en el material fecal simulado.

Palabras claves: Ácido láctico, fermentación, *Lactobacillus casei*, *Escherichia coli*, pH, material fecal simulado.





ABSTRACT

The objective of this research work was to evaluate the efficiency of lactic acid fermentation in simulated fecal matter using *Lactobacillus casei* ATTC 393. Simulated feces were prepared according to the revised formulations, which were adapted to laboratory conditions. A control group and three study groups were used, each one composed of simulated fecal material inoculated with *Escherichia coli* ATTC 25922, molasses at 15% and *Lactobacillus casei* at 0, 5, 10 and 20% respectively. Lactic acid fermentation was carried out for 10 days, the pH, the percentage of acidity (lactic acid) were evaluated daily and the growth of *Escherichia coli* and *Lactobacillus casei* every 3 days.

Results showed that the pH decreased, the production of lactic acid was greater than 3% and the growth of *E. coli* was totally inhibited from day 5. It was observed that between group 2 (*Lactobacillus casei* at 10%) and group 3 (*Lactobacillus casei* at 20%) lactic acid production had no significant difference, while group 1 (*Lactobacillus casei* at 5%) had a lower production of it. In conclusion, lactic acid fermentation using *Lactobacillus casei* was effective in producing acid and inhibiting the growth of *Escherichia coli* in the simulated fecal material.

Keywords: Lactic acid, fermentation, *Lactobacillus casei*, *Escherichia coli*, pH, simulated fecal material.



ÍNDICE GENERAL

DICTAMEN APROBATORIO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

VARIABLES E INDICADORES

CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO	2
1.1. Heces fecales	2
1.1.1. Composición de heces fecales	2
1.1.2. Heces fecales simuladas	3
1.1.3. <i>Escherichia coli</i>	5
1.2. Ácido Láctico	6
1.2.1. Fermentación ácido láctica	7

1.2.2. Bacterias ácido lácticas: <i>Lactobacillus casei</i>	9
1.2.2.1. Vía homofermentativa	11
1.2.2.2. Vía heterofermentativa.....	11
 CAPÍTULO II.....	 14
 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	 15
2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	15
2.2. MATERIALES.....	15
2.2.1. Material biológico	15
2.2.2. Insumos.....	15
2.2.3. Reactivos químicos.....	15
2.2.4. Materiales de laboratorio (vidrio, porcelana, metal, etc.).....	16
2.2.5. Aparatos y equipos	16
2.2.6. Software.....	17
2.2.7. Otros	17
2.3. MÉTODOS.....	17
2.3.1. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DE MATERIA FECAL SIMULADA	17
2.3.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EN MATERIA FECAL SIMULADA UTILIZANDO DISTINTAS CONCENTRACIONES DE <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393.....	18
2.3.2.1. Manipulación y preparación de cepas bacterianas: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	18
2.3.2.1.1. Preparación de medios de cultivos.....	18

A. Agua peptonada tamponada	18
B. Agar Mac Conkey	19
C. Agar Nutritivo	20
D. Agar Lactobacillus Man Rogosa y Sharpe (MRS).....	21
E. MC-Media Pad <i>Escherichia coli</i> y Coliformes	22
2.3.2.1.2.Activación de cepas bacterianas: <i>Escherichia coli</i> ATTC 25922 Y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	22
2.3.2.1.3.Caracterización de las cepas	24
A. Caracterización macroscópica de <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	24
B. Caracterización microscópica utilizando tinción Gram de <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	24
C. Prueba de catalasa de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393.....	25
2.3.2.1.4.Elaboración de la escala McFarland	26
2.3.2.1.5.Determinación de la Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393.....	27
2.3.2.2. Configuración experimental de fermentación ácido láctica en materia fecal simulado	27
2.3.2.3. Determinación de ácido láctico en el proceso de la fermentación.....	29
2.3.2.3.1. Estandarización de una disolución de NaOH 0.1 N	29
2.3.2.3.2. Determinación de pH.....	30
2.3.2.3.3. Determinación de ácido láctico	30
2.3.3.EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE <i>Escherichia coli</i> DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA MATERIA FECAL SIMULADA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE <i>Lactobacillus casei</i>	32
2.3.3.1. Evaluación del crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	32

2.3.3.2. Evaluación del crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i>	32
2.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
CAPÍTULO III.....	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DE MATERIA FECAL SIMULADA.....	35
3.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EN MATERIA FECAL SIMULADA UTILIZANDO DISTINTAS CONCENTRACIONES DE <i>Lactobacillus casei</i> ATTC 393.....	39
3.2.1. Manipulación y preparación de cepas bacterianas: <i>Escherichia coli</i> ATTC 25922 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	39
3.2.1.1. Activación de cepas bacterianas: <i>Escherichia coli</i> ATTC 25922 y <i>Lactobacillus</i> <i>casei</i> ATCC 393	39
3.2.1.2. Caracterización de las cepas	40
A. Caracterización macroscópica	40
B. Caracterización microscópica	42
3.2.1.3. Escala McFarland.....	44
3.2.1.4. Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i>	45
3.2.2. Configuración experimental de fermentación ácido láctica en materia fecal simulado	46
3.2.3. Determinación del ácido láctico en la fermentación	46
3.3. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE <i>Escherichia coli</i> DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA MATERIA FECAL SIMULADA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE <i>Lactobacillus casei</i>	51

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
4.1. CONCLUSIONES.....	57
4.2. RECOMENDACIONES.....	58



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables e indicadores	23
Tabla 2. Escala de heces de Bristol	4
Tabla 3. Principales componentes de las heces humanas (25)	5
Tabla 4. Características de <i>Escherichia coli</i>	6
Tabla 5. Lista de bacterias ácido lácticas más utilizadas	10
Tabla 6. Taxonomía del grupo de <i>Lactobacillus</i>	10
Tabla 7. <i>Lactobacillus casei</i> según el proceso de fermentación (43).....	11
Tabla 8. Bacterias ácido lácticas heterofermentativas obligadas(46).....	13
Tabla 9. Composición del agua peptonada tamponada	19
Tabla 10. Composición del Agar Mac Conkey	20
Tabla 11. Composición del Agar Nutritivo	20
Tabla 12. Composición del agar <i>Lactobacillus</i> MRS.....	21
Tabla 13. Formulación para la elaboración de la escala de McFarland	26
Tabla 14. Componentes para la fermentación ácido-láctica.....	28
Tabla 15. Composición de heces simuladas presentadas por distintos autores.....	37
Tabla 16. Composición de materia fecal simulada para 100 g.....	38
Tabla 17. Descripción macroscópica del <i>Escherichia coli</i>	40
Tabla 18. Descripción macroscópica del <i>Lactobacillus casei</i>	41
Tabla 19. Comparación de características microscópicas entre <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	44
Tabla 20. Datos para estandarización de una disolución de NaOH 0.1N	47
Tabla 21. Análisis de varianza del porcentaje de acidez obtenido durante 10 días de estudio a distintas concentraciones de <i>L. casei</i>	48
Tabla 22. Análisis por el método de Tukey.....	48

Tabla 23. Comportamiento *cuantitativo* de *Escherichia coli* durante 10 días de fermentación en UFC/g 53

Tabla 24. Evaluación del comportamiento de *Lactobacillus casei* durante 10 días de fermentación expresados en UFC/g 55



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura isomérica del ácido láctico	7
Figura 2. Vía homofermentativa por bacterias ácido lácticas	12
Figura 3. Vía heterofermentativa de bacterias ácido lácticas.....	12
Figura 4. Procedimiento para activar los microorganismos KWIK-STIK.....	23
Figura 5. Procedimiento para la activación de cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 (KwikStik, Microbiologics).....	23
Figura 6. Procedimiento de la tinción Gram	25
Figura 7. Sistema usado para la determinación de ácido láctico.....	31
Figura 8. Heces fecales simuladas	36
Figura 9. Concentración de <i>Escherichia coli</i> en las heces simuladas en Medio MC- Pad EC	38
Figura 10. a) Crecimiento en agar Mac Conkey de <i>Escherichia coli</i> (b)Crecimiento en agar Nutritivo de <i>Escherichia coli</i> (c) Crecimiento en agar Man Rogosa y Sharpe de <i>Lactobacillus</i> <i>casei</i> (MRS).....	40
Figura 11. Observación macroscópica de <i>Escherichia coli</i> en agar Mac Conkey.....	41
Figura 12. Observación macroscópica de <i>Lactobacillus casei</i> en agar MRS.....	42
Figura 13. Observación microscópica de <i>Escherichia coli</i> a 100X	43
Figura 14. Observación microscópica de <i>Lactobacillus casei</i> a 100X.....	43
Figura 15. Curva de McFarland	44
Figura 16. Curva del crecimiento bacteriano de <i>Lactobacillus casei</i> ATTC 393 a diferentes temperaturas	46
Figura 17. Diagrama de caja de bigotes del efecto de la concentración de <i>Lactobacillus casei</i> en la producción de Ac. Láctico.....	49
Figura 18. pH durante 10 días de fermentación	51

Figura 19. Evaluación del comportamiento de *Escherichia coli* en MC- media Pad durante la fermentación ácida láctica..... 53

Figura 20. Evaluación del comportamiento de *Escherichia coli* expresado en (UFC/g) durante la fermentación..... 54

Figura 21. Evaluación del comportamiento de *Lactobacillus casei* expresado en UFC/g durante 10 días de fermentación..... 55



INTRODUCCIÓN

Hoy en día millones de personas continúan pasando por grandes dificultades para tener acceso a los servicios elementales como el uso indispensable del agua, saneamiento e higiene. Los sistemas de saneamiento *in situ*, como las letrinas de pozo, tanques sépticos, pozos de lixiviación se utilizan ampliamente en todo el mundo, algunas veces utilizadas como soluciones temporales o como tecnología permanente, alrededor de 2700 millones de personas hacen uso de estos sistemas diariamente (1–3). El saneamiento convencional basado en agua tiene como objetivo aumentar la higiene, pero no es aplicable en todas las sociedades del mundo, debido al alto costo de mantenimiento y operación (4,5). Alrededor del mundo, 6 de cada 10 personas no cuentan con acceso a un saneamiento seguro y al menos 892 millones siguen practicando la defecación al aire libre de forma antihigiénica (6). Sin embargo, la gestión deficiente del material fecal causa contaminación en el agua y en el suelo (5,7).

La exposición al material fecal no tratada debe ser considerados como un riesgo para la salud debido a la presencia de patógenos, que son causantes de más de 50% de muertes infantiles alrededor del mundo, además del impacto negativo en la salud pública que puede causar.(8–10)

En el Perú, el 8,8% del total de la población utilizan pozo ciego o negro para la eliminación de las excretas, 5.4% mediante pozo séptico 1.3% utiliza el río o acequia y el 7.2% de la población no presenta ningún sistema para la eliminación de excretas (11).

De la misma manera el uso de desechos humanos es un desafío debido a su alta variabilidad según la ingesta de alimentos en su dieta diaria, forma de vida y la ubicación geográfica por lo que actualmente el material fecal simulado proporciona una materia prima consistente y bien caracterizada con el fin de reducir problemas de salud y seguridad (12,13).

Como parte de la prevención de contaminación ambiental y para el bienestar de personas de países de bajos recurso es importante la eliminación segura de desechos humanos (14).

Las Naciones Unidas propuso la agenda 2030 para el desarrollo sostenible que se centra en buscar soluciones a problemas sociales, ambientales y culturales actuales. Además, desarrolla soluciones que se presenten como oportunidad de mejora para los países y sus sociedades con el fin de mejorar la vida de todos. Esta agenda cuenta con 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible, donde el sexto trata sobre el agua limpia y saneamiento, por lo que el presente proyecto busca generar conocimientos que permitan alcanzar una solución sustentable respecto a la mejora de gestión de desechos orgánicos en las personas (7).

Existen varios métodos que tratan las heces fecales como la utilización del amoníaco, levadura y cal y fermentación de ácido láctico, con el propósito de reducir la contaminación fecal, los diversos tratamientos difieren en eficacia, como el uso de cal requiere adiciones de cantidades de cal cada cierto tiempo, el uso de amoníaco causa preocupación en el olor que produce y el rebrote de patógenos (1,15). Las heces fecales naturalmente son un fertilizante natural, debido su composición. Sin embargo, presenta altas concentraciones de patógenos, como coliformes fecales, huevos helmintos, *Escherichia coli*, *salmonella*, *estreptococos* fecales entre otras bacterias (16,17).

El tratamiento de materia fecal mediante la fermentación permitirá minimizar riesgos ambientales, un adecuado manejo de estos residuos puede ser aprovechado en distintos campos, como fertilizantes a nivel agrícola.

La fermentación ácido láctica actualmente es un método de bajo, costo, factible para lograr una acidificación e inhibir las bacterias, existen distintos estudios usando bacteria ácido lácticas como el *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* extraídas de distintas materias primas como el arroz y la yuca usadas para desinfectar lodos fecales.

La capacidad antimicrobiana se da al disminuir el pH intracelular de los patógenos (18–20). En el presente trabajo se propone realizar una fermentación ácido láctica utilizando *Lactobacillus casei* ATTC 393 en heces simuladas conteniendo *Escherichia coli* ATCC 25922 como organismo patógeno indicador. Los resultados beneficiarían en el tratamiento de materia fecal en baños de saneamiento *in situ*, utilizando *L. casei* para poder lograr una fermentación ácido láctica en materia fecal para que pueda eliminar patógenos.



HIPÓTESIS

Dada la existencia de investigaciones que utilizan procesos fermentativos, es probable, que la fermentación ácido láctica utilizando *Lactobacillus casei* pueda ser efectiva en el tratamiento de materia fecal simulada.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la fermentación ácido láctica en materia fecal simulada utilizando *Lactobacillus casei*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Formular y elaboración la composición para la elaboración de materia fecal simulada.
2. Evaluar la producción de ácido láctico en materia fecal simulada utilizando distintas concentraciones de *Lactobacillus casei* ATTC 393.
3. Evaluar el comportamiento de *Escherichia coli* durante el proceso de fermentación de la materia fecal simulada a distintas concentraciones de *Lactobacillus casei*

VARIABLES E INDICADORES

Tabla 1. Variables e indicadores

Variables	Indicadores
Tratamiento de materia fecal simulada	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración de <i>Lactobacillus casei</i>
Variables dependientes	Indicadores
Fermentación ácido-láctica	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración de ácido láctico • Inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> • Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i>.



1. MARCO TEÓRICO

1.1. Heces fecales

Los valores promedio del material fecal húmedo producido por una persona sana oscila entre 128 g/día y 250 g/día y la frecuencia de defecación es de 1,20 defecaciones por día de acuerdo con un estudio realizado por Rose et. al(13). La variación de sus características químicas y físicas están relacionadas con la dieta y salud de la persona (21)

1.1.1. Composición de heces fecales

Las heces fecales están compuestas de proteínas, grasas, fibra, biomasa bacteriana, materiales inorgánicos y carbohidratos. Los elementos principales en las heces fecales húmedas son oxígeno, hidrógeno, carbono y nitrógeno al 74%, 10% 5% y 0.7% respectivamente.

La fracción orgánica está compuesta por 84 – 93% del material sólido seco de las heces fecales, donde el 25 a 54 % es la biomasa bacteriana, siendo el elemento principal de esta fracción, en su mayoría representados por *Escherichia coli*. El restante de esta fracción está compuesto por carbohidratos, fibras, proteínas y grasas no digeridos. La fracción inorgánica pertenece al 2,25 % del peso húmedo de la materia fecal y 9,02 % del peso seco y se compone de los sólidos restantes como fosfatos de calcio y hierro, secreciones del intestino y cantidad reducida de componentes secos provenientes de los jugos gástricos (14,21).

El pH se encuentra entre valores de 5.3 a 7.5. La producción de gas de las heces humanas se sitúa en 0,02–0,28/kg de heces húmedas (13,22).

El material fecal también tiene diferentes estructuras físicas introducidas como “Escala de heces de Bristol” por Lewis y Heaton (23,24) donde la clasifican en 7 tipos, siendo tipo 1 (bultos duros) hasta el tipo 7 (diarrea acuosa), además tipos los 3 y 4 (salchicha dura y grumosa) se clasificarían como formas de heces normales, estas formas y características se muestran en la Tabla 2.

1.1.1. Heces fecales simuladas

El uso de heces fecales reales es una tarea desafiante debido a su alta variabilidad según la ingesta de alimentos en su dieta diaria, forma de vida y la ubicación geográfica, factores que dificultan la ejecución de experimentos repetibles.

Además, las heces humanas también liberan olores desagradables debido a su carga bacteriana y otros patógenos humanos que pueden desarrollar masivamente en las heces durante el almacenamiento. Las heces simuladas pueden proporcionar un material reproducible de manera consistente y aliviar estos desafíos. La mayoría de los estudios individuales buscaron desarrollar un material simulante representativo de propiedades físicas, químicas (8,25).

Las heces fecales simuladas deben tener una composición química como se muestra en la Tabla 3. La literatura presenta diversas formulaciones que representen composición química, consistencia y el poder de retener agua de las heces humanas.

Es posible que un simulador sea el mejor para estudiar la tecnología de deshidratación, mientras que otro sea más representativo para estudiar la destrucción pirolítica de las heces. (14,22,25).

Tabla 2. Escala de heces de Bristol

Tipo	Características	Interpretación
	1 Trozos duros separados, que pasan con dificultad.	Estreñimiento
	2 Como salchicha compuesta con fragmentos.	Estreñimiento ligero
	3 Con forma de morcilla con grietas en la superficie.	Normal
	4 Como una salchicha o serpiente, lisa y blanda.	Normal
	5 Trozos de masa pastosa con bordes irregulares.	Falta de fibra
	6 Fragmentos pastosos, con bode irregulares.	Diarrea ligera
	7 Acuosa, totalmente líquida.	Diarrea

Fuente: Lewis y Heaton ((24)

El uso de patógenos entéricos humanos como organismos indicadores bacterianos son utilizados para optimizar las tecnologías de reducción, entre este grupo se encuentran los coliformes totales, enterococos, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Proteus mirabilis*, siendo el grupo de coliformes y *Escherichia coli* el grupo utilizad como indicador de contaminación y asociado históricamente con problemas de salud pública (19,26,27).

Tabla 3. Principales componentes de las heces humanas (25)

Componentes	Cantidad
Lípidos	5-25%
Carbohidratos (Fibra)	10-30%
Material nitrogenado	≤ 2-3%
Minerales (principalmente K, Ca y P)	5-8%
Desecho bacteriano	10-30%

1.1.2. *Escherichia coli*

Los métodos de detección de patógenos son importantes para minimizar riesgos en la salud pública y son utilizados comúnmente para vigilar, evaluar el tratamiento que se utilice y la investigación.

Las heces fecales frescas contienen grandes cantidades de patógenos y varios organismos facultativos, los cuales son dañinos para los humanos (18).

En el microbiota natural del estómago en humanos, así como en animales homeotermos, llamados así a los animales de sangre caliente, se encuentra el grupo de coliformes, dentro de ellas está las bacterias anaerobias facultativas intestinales como es la *Escherichia coli* ocupa el mayor porcentaje.

Las características de estas bacterias se resumen en la Tabla 4. La literatura refiere que existe de 10^6 a 10^8 UFC/ mL de *Escherichia coli* en las heces fecales, por lo que es el principal indicador de contaminación fecal más utilizados (15,26,28).

Tabla 4. Características de *Escherichia coli*

Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género	<i>Echerichia</i>
Especie	<i>Escherichia coli</i>
Forma	Bacilo
Afinidad tintorial	Gram negativo

Es la única especie la familia *Enterobacteriaceae* que presenta la enzima β -Dglucuronidasa (GUD), la cual es responsable de la degradación del sustrato 4-metilumbeliferil- β -D- glucurónico (MUG), para formar 4-metilumbeliferona . Además, la enzima β -D-galactosidasa (GAL) es positivo a la prueba de rojo de metilo y son capaces de descarboxilar el ácido L-glutámico, pero no pueden desarrollarse en caldo de cianuro de potasio y no utiliza sólo al citrato como fuente de carbono (29).

1.2. Ácido Láctico

Es un importante ácido orgánico empleado en la elaboración de alimentos, fármacos, además de la industria química y biotecnológica con beneficios ambientales (30). El químico Carl Wilhelm Scheele fue quien descubrió el ácido láctico en 1780, a partir de la leche agria. Posteriormente, Pasteur descubre al ácido láctico capaz ser fermentado por algunos microorganismos. Y finalmente en apoyo a Pasteur, en 1881, Frémy produce la primera producción industrial de ácido láctico (31).

La síntesis del ácido láctico se puede dar ya sea químicamente o por fermentación microbiana. La síntesis química está basada en el lactonitrilo. La producción biotecnológica de ácido láctico mediante fermentación microbiana presenta mayores ventajas como la utilización de sustratos de bajo costo, temperaturas relativamente bajas y alta pureza (31,32).

La molécula de ácido láctico contiene un carbono quiral y se puede encontrar en dos formas isoméricas diferentes: L y D como se observa en la Figura 1. La proporción de cada isómero confiere diferentes propiedades físicas al producto final. El isómero del ácido D-láctico en dosis altas se considera dañino para los humanos y puede causar acidosis o descalcificación. Por lo tanto, el isómero del ácido L-láctico es el preferido por las industrias farmacéutica y alimentaria (32,33).^F

1.2.1. Fermentación ácido láctica

La fermentación del ácido láctico es un método aplicado para la reducción de patógenos gracias a su efectividad, bajo costo y bajo riesgo para la salud. Esta fermentación produce varios ácidos que reducen el pH de las heces fecales y compuestos que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, por lo que ofrece una nueva alternativa de saneamiento de heces antes de su eliminación en baños portátiles.

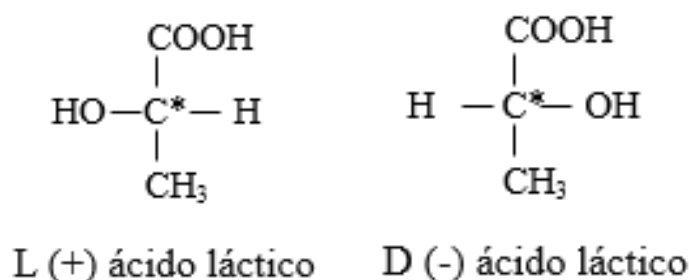


Figura 1. Estructura isomérica del ácido láctico

La fermentación del ácido láctico se usó como tecnología de pretratamiento para evaluar el efecto de desinfección de las bacterias ácido lácticas en heces fecales (18,20). El proceso de fermentación se ve afectado por varios factores, como la temperatura, el pH, la concentración de sustrato, microorganismos, la composición del medio y las condiciones de crecimiento, que deben ajustarse a los requisitos específicos de las bacterias, así como a los factores que afectan la velocidad de fermentación (34,35).

Además, la capacidad del ácido láctico para suprimir patógenos se atribuye parcialmente al poder que tiene para penetrar la membrana citoplasmática de los microorganismos en la forma asociada, lo que da como resultado la disminución del pH intracelular de los patógenos (15,36). El uso de fuentes suplementarias de carbono lábil como glucosa, manosa, galactosa y fructuosa son importantes para la mejorar de producción de ácido láctico (19). El procesamiento ecológico y la capacidad fermentable de muchas de las materias primas o subproductos agrícolas y agroindustriales, respectivamente, los convierte en candidatos atractivos en biotecnología de fermentación para producir un producto de valor agregado con múltiples aplicaciones (37).

Estudios previos realizaron la fermentación ácido láctica (LAF) tanto en orina como en materia fecal, lodos sépticos y desinfección de terra Preta, logrando la reducción de patógenos a distintos tiempos y usando distintas concentraciones. (15,18,20,38).

1.2.2. Bacterias ácido lácticas: *Lactobacillus casei*

Las bacterias del ácido láctico son microorganismos ampliamente utilizados en la industria debido a su importancia en numerosas aplicaciones en la industria. Son grampositivas, microaerófilas y catalasa negativa, no son móviles, tienen bacilos y cocos que no forman esporas, también, son anaerobios facultativos, por lo que no utilizan oxígeno para la producción de energía, pero pueden crecer en presencia de oxígeno.

Además de tener bajo contenido de guanina y citocina, así mismo presenta tolerancia a la acidez debido a lugares naturales de procedencia como el pH bajo del estómago. Habitualmente se encuentran presentes en el sistema digestivo y la vagina (33,34,39).

Las bacterias ácido lácticas son capaces de convertir sustratos de carbohidratos en ácidos orgánicos y producir una amplia gama de metabolitos, las bacterias ácido lácticas más utilizadas se pueden observar en la Tabla 5, además de tener actividades metabólicas, usadas como ingredientes de sabor, compuestos antimicrobianos, vitaminas y polisacáridos extracelulares (40,41).

Los ácidos orgánicos, incluidos los ácidos propiónico, fórmico, acético y láctico, crean un entorno perjudicial para el desarrollo de microorganismos patógenos y de descomposición. Se dividen generalmente en dos categorías bacterias homofermentativa y heterofermentativa, según su metabolismo.

Tabla 5. Lista de bacterias ácido lácticas más utilizadas

<i>Bifidobacterium,</i>
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lacticaseibacillus casei</i>

El género *Lactobacillus* fue propuesto por Beijerinck en 1901 e incluye microorganismos grampositivos, fermentadores, anaerobios facultativos y no formadores de esporas, la mayoría de este género producen la forma isomérica del ácido láctica. Algunas de estas especies son usadas en las industrias lácteas como la producción del yogurt y otras son usadas como para la fermentación, su taxonomía esta descrita en la Tabla 6 (42)

Tabla 6. Taxonomía del grupo de *Lactobacillus*

Filo	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familia	<i>Lactobacillaceae</i>
Género	- <i>Lactobacillus</i>
	- <i>Paralactobacillus</i>
	- <i>Pediococcus</i>

Las bacterias ácido lácticas que utilizan la vía homofermentativa producen dos lactatos a partir de una molécula de glucosa, obteniendo ácido láctico como único producto del proceso.

Mientras que en el proceso de heterofermentación, una molécula de glucosa se convierte en etanol y ácido láctico, además de formar otros productos como ácido acético, etanol, CO₂. Por lo tanto, ambas producen principalmente ácido láctico, pero la fermentación heterofermentativa forma algunos subproductos (43–46). En caso del *Lactobacillus casei* es una bacteria homofermentativa como se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7. *Lactobacillus casei* según el proceso de fermentación (43).

Género / Especie	Configuración de ácido		láctico producido
	Homofermentativa	Heterofermentativa	
<i>Lactobacillus casei</i>	+	-	L(+)

1.2.2.1. Vía homofermentativa

En esta vía el carbohidrato glucosa se metaboliza mediante la vía de Embden-Meyerhof-Parnas, por un proceso llamado glucólisis, el cual tiene como producto final al ácido láctico (Figura 2), donde una la glucosa produce dos moléculas de ácido láctico, que son más de 0,90 g/g. Además, la conversión de piruvato a ácido láctico por lactato deshidrogenasa (LDH) requiere NADH/H⁺ citosólico (46).

1.2.2.2. Vía heterofermentativa

Compuesta por bacterias obligadas o facultativas, a partir de una molécula de glucosa producen ácido láctico, etanol y dióxido de carbono (Figura 3). Las bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligadas fermentan azúcares a través de la vía del ácido 6-fosfogluónico/fosfocetolasa.

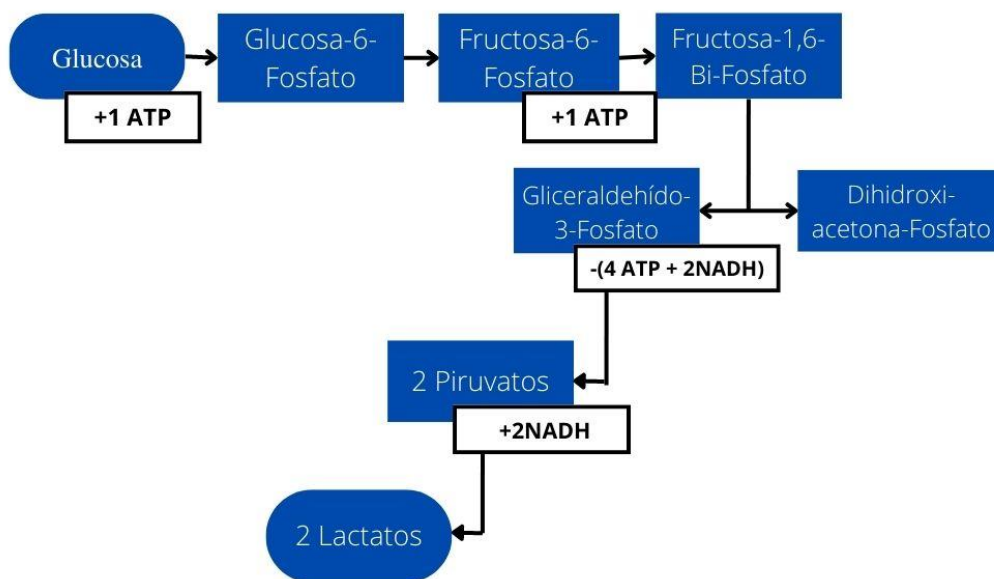


Figura 2. Vía homofermentativa por bacterias ácido lácticas

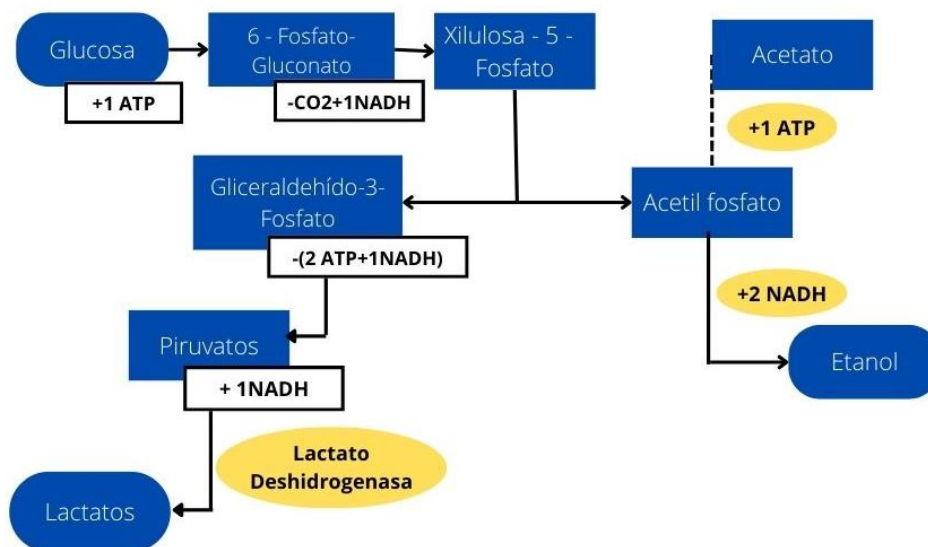


Figura 3. Vía heterofermentativa de bacterias ácido lácticas

El primer paso en la descomposición de la glucosa mediante la vía de las pentosas fosfato conduce a gliceraldehído-3-fosfato, acetyl fosfato y dióxido de carbono. El gliceraldehído-3-fosfato entra en la vía glucolítica, mediante la cual es transformada en ácido láctico; sin embargo, el fosfato de acetilo se convierte en ácido acético y/o etanol (la glucosa produce ácido láctico, dióxido de carbono y etanol y el ATP o glucosa produce ácido láctico, dióxido de carbono y acetato y 2 ATP y 2 NADH). Algunas de las bacterias ácido lácticas heterofermentadoras obligadas se muestran en la Tabla 8 (46).

Tabla 8. Bacterias ácido lácticas heterofermentativas obligadas(46).

BAL heterofermentativas

Levilactobacillus brevis

Limosilactobacillus fermentum

Lactobacillus parabuchneri

Limosilactobacillus reuteri



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

Laboratorio de Investigación de Agua y Medio Ambiente (Universidad Tecnológica del Perú - Arequipa)

2.2. MATERIALES

2.2.1. Material biológico

- *Lactobacillus casei* ATCC 393
- *Escherichia coli*. ATCC 25922

2.2.2. Insumos

- Agar Lactobacillus Man Rogosa Sharpe (MRS), HIMEDIA
- Agar Mac Conkey w/CV, NaCl y 0.15% Sales bilis, HIMEDIA
- Agar Nutritivo (APHA, ISO), Scharlau
- Agua destilada
- Agua peptonada tamponada (ISO), Scharlau
- Cáscara de *psyllium*, Salud Vida
- Celulosa microcristalina, Insuquímica
- MC- Media Pad *Escherichia coli* Coliformes, Merck
- Melaza, Agriminilla

2.2.3. Reactivos químicos

- Ácido oleico, Sigma Aldrich
- Cloruro de Bario, SowTest
- Cloruro de Sodio AR, CDH
- Cloruro de Potasio P.A., Merck

- Hidróxido de Sodio A.C.S., Spectrum
- Ftalato de Potasio, Sigma Aldrich
- Fenolftaleína pH indicador, CDH
- Peróxido de hidrógeno, Laboratorio Alkofarma

2.2.4. Materiales de laboratorio (vidrio, porcelana, metal, etc.)

- Baguetas
- Beakers de 10, 50, 100 y 250 mL
- Bureta de 10 mL
- Matraz aforado de 10,100, 250 y 1000 mL
- Erlenmeyers de 50, 100 y 250 mL
- Pesas sustancias
- Picetas
- Placas Petri estériles
- Propipetas

2.2.5. Aparatos y equipos

- Autoclave BIOBASE, BKQ-Z30I
- Balanza analítica Metter Toledo, ME204
- Balanza Aviator 2000OHAUS, A21P40DAR
- Bomba al Vacío diaphragm Vacuum Pump, GM-0.50
- Cabina de seguridad BIOBASE, FH1200
- Contador de colonias Tecnal, CP-600/1
- Espectrofotómetro, Thermo Scientific, Genesys 150
- Estufa BIOBASE, BOV-T70C
- Incubadora de convección natural 55L INCUCCELL, ECO line
- Micropipetas volumétricas Witeg Germany

- Microscopio binocular AmScope, SME-F8BH
- Potenciómetro OHAUS, Starter 3100M
- Refrigerador vertical Ventus
- Shaker DLAB, SK-O330-Pro
- Vortex, MX-S

2.2.6. Software

- Minitab 19.2020.1

2.2.7. Otros

- Asa de Digrasky
- Asa de Kolle
- Espátulas
- Mechero
- Papel aluminio
- Papel Kraft
- Parafilm, Laboratory Film

2.3. MÉTODOS

2.3.1. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DE MATERIA FECAL SIMULADA

El uso de desechos humanos en estudios de laboratorio puede plantear problemas de salud, seguridad y variabilidad; por lo que se definió la composición para la fabricación de materia fecal simulada.

Se revisó diferentes procedimientos en la literatura (12,22,25,47,48) y se eligió propuestas similares con la experimentación a realizar como investigaciones que utilicen material fecal simulado para tratamiento en los sistemas de saneamiento *in situ.*, se modificó a condiciones de laboratorio.

Se utilizó una composición que tenga la cantidad suficiente de carbohidratos, lípidos, minerales, material nitrogenado y desecho bacteriano como se observa en la Tabla 3. Para este último elemento, se utilizó *Escherichia coli*, el cuál en las heces fecales reales tiene una concentración aproximada de $1.5 \cdot 10^6$ - $1.5 \cdot 10^8$ UFC/mL, por lo que se utilizó un inóculo necesario.

La preparación se realizó en un recipiente en el cuál primero se mezclaron los componentes secos. Luego se añadió ácido oleico y se homogeneizó, por último, se agrega lentamente agua destilada y el inóculo de *Escherichia coli*. El recipiente fue cubierto y se dejó reposar por 1.5 horas, tiempo óptimo donde el Psyllium se gelifica a temperatura ambiente (19). Después de ese tiempo, se verifica la concentración de *Escherichia coli* en las heces simuladas preparadas siguiendo el procedimiento de 2.3.3.1.

2.3.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EN MATERIA FECAL SIMULADA UTILIZANDO DISTINTAS CONCENTRACIONES DE *Lactobacillus casei* ATTC 393.

2.3.2.1. Manipulación y preparación de cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATTC 25922 y *Lactobacillus casei* ATCC 393

2.3.2.1.1. Preparación de medios de cultivo

A. Agua peptonada tamponada

Es un medio líquido no selectivo, con el fin de enriquecer el crecimiento de bacterias. La preparación se realizó según el proveedor Scharlau, que consistió en disolver 20 g del polvo en 1000 mL de agua destilada. Se distribuye en recipientes y se lleva a la autoclave BIOBASE a 121°C para esterilizar durante 15 minutos. La composición se puede observar en la Tabla 9.

Tabla 9. Composición del agua peptonada tamponada

Componentes	g/L
Peptona caseína	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato de di sodio (anhidro)	3.5
Fosfato de potasio	1.5

B. Agar Mac Conkey

Este agar es utilizado para el aislar, seleccionar y diferenciar de *Escherichia coli*. que crecen de color rojo o rosado y son capaces de fermentar lactosa a través de la formación de un halo turbio.

El medio se preparó siguiendo el procedimiento del fabricante HiMedia que consistió en pesar 51.55 g para 1000 mL de agua destilada. Después se calentó hasta ebullición para disolver el medio completamente. Luego se esteriliza a 121°C en autoclave BIOBASE por 15 minutos. Se esperó a que enfríe a 45-50 °C para finalmente se distribuye en placas Petri estériles. La composición del agar Mac Conkey se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Composición del Agar Mac Conkey

Componentes	g/L
Peptona	20.0
Lactosa	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Sal de Bilis	1.5
Rojo neutro	0.05
Cristal violeta	0.001
Agar	15.0

C. Agar Nutritivo

El Agar Nutritivo es un medio simple con capacidad nutritiva para reforzar el crecimiento de las bacterias. Fue utilizado para la replicación y manipulación de la bacteria *Escherichia coli*. Se preparó siguiendo las instrucciones del proveedor Scharlau, se disolvió 23 g en 1000 mL de agua destiladas, se llevó a ebullición. Luego, se esterilizó a 121°C en autoclave BIOBASE por 15 minutos. Se enfrió a 45-50 °C. Finalmente, se distribuyó en placas Petri estériles. Los componentes del agar nutritivo se indica en la Tabla 11.

Tabla 11. Composición del Agar Nutritivo

Componentes	g/L
Peptona	5.0
Extracto de carne	3.0
Agar	15.0

D. Agar *Lactobacillus* Man Rogosa y Sharpe (MRS)

Agar recomendado para todas las especies de *Lactobacillus*. Para la preparación se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante HiMedia, se pesó 67.15 g para 1000 mL de agua destilada.

Se disuelve el medio en ebullición. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos en autoclave BIOBASE, y finalmente se dispensa en placas Petri estériles a 45-50 °C. La composición del agar MRS se indica en la Tabla 12.

Tabla 12. Composición del agar *Lactobacillus* MRS

Componentes	g/L
Peptona proteasa	10.0
Peptona HM	10.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa (Glucosa)	20.0
Tween 80	1.0
Citrato de amonio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico hidrogenado	2.0
Agar	12.0

E. MC-Media Pad *Escherichia coli* y Coliformes

El MC-Media Pad EC utilizado para detectar y enumerar *Escherichia coli* y coliformes a través de sustratos cromogénicos específicos para β - galactosidasa y β – glucuronidasa. MC-Media Pad EC está compuesto por una hoja adhesiva única, un cojinete de prueba recubierta con un medio selectivo y un sustrato cromogénico, y un polímero de absorción de agua, y una película de cubierta transparente, para reconstituir automáticamente el medio (49).

2.3.2.1.2. Activación de cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Lactobacillus casei* ATCC 393

Cada unidad contenía un gránulo liofilizado del microorganismo, una ampolla hidratante y un hisopo de inoculación. Ambas cepas se conservaron de 2 - 8 °C en el refrigerador vertical Ventus. Para la activación de ambas bacterias se siguió el procedimiento propuesto por Kwik-Stik, descrito en la Figura 4 (50), para la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 (KwikStik, Microbiologics), se utilizó medio de cultivo Mac Conkey y medio de cultivo nutritivo; y para la cepa del *Lactobacillus casei* ATCC 393 (KwikStik, Microbiologics) en medio de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS).

Primero se dejó a temperatura ambiente ambas bacterias liofilizadas para su adaptación (Figura 5A), luego se retiró las etiquetas y se las colocó en la placa de cultivo principal (Figura 5B). Seguidamente se apretó la parte superior de la ampolla Kwik-Stik con lo cual se liberó el líquido hidratante, (Figura 5C), luego se apretó en la parte inferior de la unidad para obtener al gránulo totalmente disuelto en el medio líquido (Figura 5D).

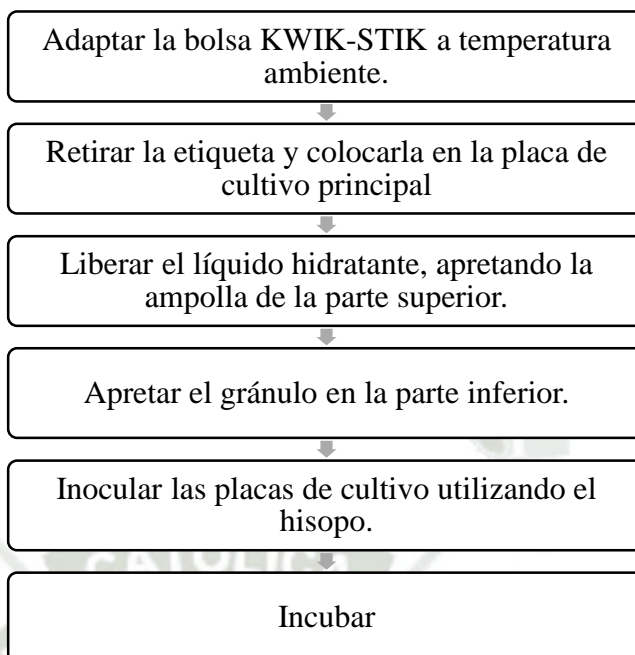


Figura 4. Procedimiento para activar los microorganismos KWIK-STIK

Posteriormente, el hisopo ya se encontraba saturado de material hidratado y se procedió a inocular en las placas de cultivo Mac Conkey, nutritivo y MRS respectivamente, se sembró por estría con la finalidad de obtener colonias aisladas (Figura 5E). Finalmente, las placas fueron llevadas a la incubadora de convección natural INCUCCELL a 37°C por 18-24 horas para *Escherichia coli* y por 72 horas para *Lactobacillus casei* (Figura 5F).

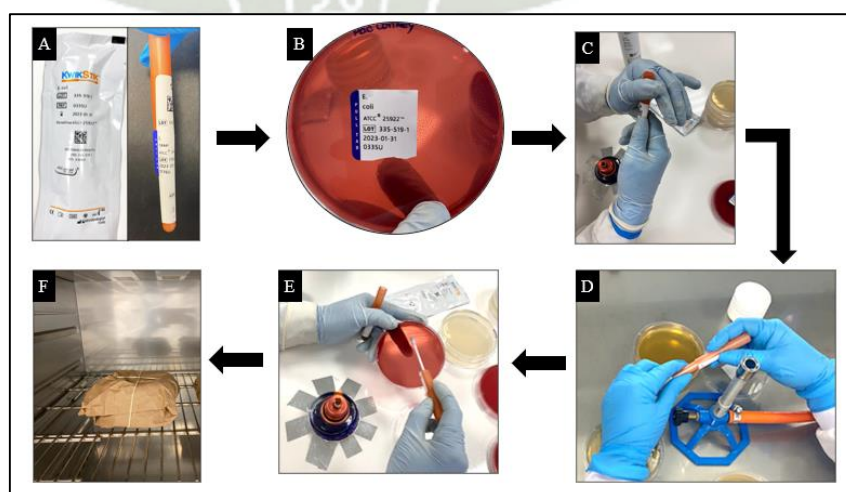


Figura 5. Procedimiento para la activación de cepas de *Escherichia coli*

ATCC 25922 *Lactobacillus casei* ATCC 393 (KwikStik, Microbiologics)

2.3.2.1.3. Caracterización de las cepas

Para mejorar la manipulación en la experimentación y evitar la contaminación en las placas activadas, se realizó subcultivos a partir de las placas activadas. Primero se colocó el material necesario en la cabina y cerca de un mechero Bunsen, posteriormente el asa de Kolle se esterilizó flameando el asa hasta alcanzar rojo incandescente y después se dejó enfriar cerca a la llama, seguidamente, se tomó un inóculo y se sembró por agotamiento. De igual forma que la activación, la cepa de *Lactobacillus casei* se sembró en agar MRS y la cepa de *Escherichia coli* en agar Mac Conkey y agar nutritivo. Finalmente, las placas fueron llevadas a la incubadora de convección natural INCUCCELL a 37°C por 18-24 horas para *Escherichia coli* y por 72 horas para *Lactobacillus casei*.

Estas placas fueron utilizadas para la caracterización macroscópica, microscópicas y elaboración del material fecal simulado.

A. Caracterización macroscópica de *Escherichia coli* y *Lactobacillus casei*

A partir de las placas subcultivadas se realizó la descripción macroscópica de las colonias, de acuerdo con la forma, tamaño, color, lustre y superficie.

B. Caracterización microscópica utilizando tinción Gram de *Escherichia coli* y *Lactobacillus casei*

Las colonias individuales fueron confirmadas mediante tinción de Gram. Primero se realizó un frotis de la muestra, que consistió en colocar una gota de agua destilada en una lámina portaobjetos, seguido se tomó con un asa de Kolle colonias individuales y se fijó al calor usando un mechero Bunsen.

Después se continuó la tinción Gram que consistió en 4 pasos descrita en la Figura 6, en la cual el cristal violeta actuó como colorante primario, el Lugol actuó como fijador del colorante, el alcohol acetona utilizado para destruir la capa lipídica de las bacterias Gram negativas, y finalmente la safranina como colorante de contra tinción. (51,52). Después se observó en el microscopio a 100X, se describió la morfología de las bacterias, color y presencia de esporas y flagelos (53).

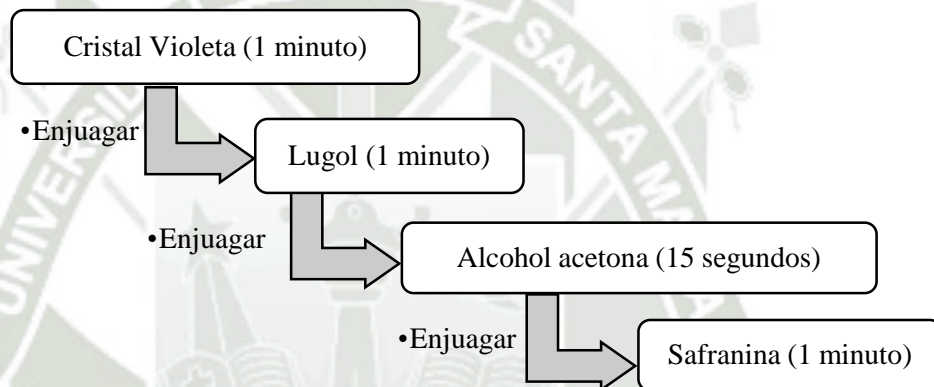


Figura 6. Procedimiento de la tinción Gram

C. Prueba de catalasa de *Lactobacillus casei* ATCC 393

Para confirmar la presencia de la actividad de la catalasa para el microorganismo *Lactobacillus casei*, se tomó una colonia aislada que creció por 48 horas en agar MRS, se mezcla con una gota de peróxido de hidrógeno comercial (3% v/v).

Finalmente, en presencia de catalasa el peróxido de hidrógeno produce burbujas debido a la producción de agua y oxígeno (54–56).

2.3.2.1.4. Elaboración de la escala McFarland

Primero se preparó ácido sulfúrico al 1% (H_2SO_4) como reactivo portador del ion sulfato y cloruro de bario al 1% ($BaCl_2$) como portador del ion bario. Seguidamente, en tubos de vidrio de tapa rosca se preparó la escala de McFarland utilizando la Tabla 13 para la relación de volúmenes. Se agitó en el vórtex MX-S durante 30 segundos. Finalmente, se midió a 600 nm en el espectrofotómetro Thermo Scientific.

Tabla 13. Formulación para la elaboración de la escala de McFarland

N°	BaCl ₂ (1%)	H ₂ SO ₄ (1%)	Concentración (UFC/mL)
0.05	0.05	9.95	1.5*10 ⁸
1	0.1	9.9	3.0*10 ⁸
2	0.2	9.8	6.0*10 ⁸
3	0.3	9.7	9.0*10 ⁸
4	0.4	9.6	12*10 ⁸
5	0.5	9.5	15*10 ⁸
6	0.6	9.4	18*10 ⁸
7	0.7	9.3	21*10 ⁸
8	0.8	9.2	24*10 ⁸
9	0.9	9.1	27*10 ⁸
10	1.0	9.0	30*10 ⁸

2.3.2.1.5. Determinación de la Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* ATTC 393.

Para la realización de la curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* ATTC 393. Se inició realizando un precultivo, que consistió en inocular en un frasco Erlenmeyer conteniendo 50 mL de agua peptonada tamponada y de *Lactobacillus casei* aislada del medio de cultivo MRS. El frasco Erlenmeyer fue incubado a 37°C durante toda la noche en la incubadora de convección natural INCUCCELL.

A partir de ese punto se iniciaron las mediciones del crecimiento bacteriano mediante la lectura de absorbancia en 0, 1, 3, 6, 9, 24 horas y después cada 24 horas durante 5 días utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific

2.3.2.2. Configuración experimental de fermentación ácido láctica en materia fecal simulado

Primero se realizó un precultivo de *Lactobacillus casei* durante 96 horas a temperatura ambiente para que las bacterias crecieran exponencialmente, después se midió en el espectrofotómetro Thermo Scientific y se utilizó la ecuación 1 para obtener la concentración de McFarland 2.0 ($6.0 \cdot 10^8$ UFC/mL) Para el sustrato se utilizó 15% de melaza que es un líquido de color oscuro denso y viscoso, obtenido del producto final de fabricación de diferentes azúcares como la sacarosa, glucosa o fructuosa provenientes de la caña de azúcar. Ésta contiene sales minerales y amino compuestos, se usó como fuente suplementaria para amplificar la producción del ácido láctico (26,58).

La experimentación se realizó por triplicado utilizando 65 g de material fecal simulado, el inóculo utilizado de *Escherichia coli* fue medido en el espectrofotómetro Thermo Scientific y se utilizó la Ecuación 1 para obtener una concentración final aproximada de $1.5 \cdot 10^7$ - $1.5 \cdot 10^8$ UFC/ mL en las heces fecales simuladas para un peso final de 100 g.

Para la experimentación se utilizaron 4 grupos de estudios que contenían 0%, 5%, 10% y 20% p / p de precultivo de *Lactobacillus casei* y 15% p / p de melaza a los tambores de tratamiento (1,2). Cada muestra se fermentó en un recipiente herméticamente cerrado y se mantuvo a temperatura ambiente, según como se detalla en la Tabla 14. Se tomó 1 g de muestra de cada tratamiento y se analizaron para determinar el pH, la concentración de ácido láctico y el recuento de *Escherichia coli* y *Lactobacillus casei*.

Tabla 14. Componentes para la fermentación ácido-láctica

Componente (%p/p)	Grupo			
	Control	1	2	3
<i>Lactobacillus casei</i> (g)	0	5	10	20
Melaza (g)	15	15	15	15
Material fecal con				
<i>Escherichia coli</i>	65	65	65	65
H ₂ O destilada estéril	20	15	10	0
Peso final (g)	100	100	100	100

- **Grupo control:** La materia fecal simulada únicamente será inoculada con *Escherichia coli* a una densidad poblacional aproximada $1.5 \cdot 10^7$ - $1.5 \cdot 10^8$ UFC/mL.
- **Grupo 1:** Material fecal simulado inoculado con *Escherichia coli* a una concentración de aproximada $1.5 \cdot 10^7$ - $1.5 \cdot 10^8$ UFC/mL y 5.0 % p/p del precultivo *Lactobacillus casei* a una concentración de McFarland 2.0.
- **Grupo 2:** Material fecal simulado inoculado con *Escherichia coli* a una concentración de aproximada $1.5 \cdot 10^7$ - $1.5 \cdot 10^8$ UFC/mL y 10% p/p del precultivo *Lactobacillus casei* a una concentración de McFarland 2.0.
- **Grupo 3:** Material fecal simulado inoculado con *Escherichia coli* a una concentración de aproximada $1.5 \cdot 10^7$ - $1.5 \cdot 10^8$ UFC/ mL y 20% p/p del precultivo *Lactobacillus casei* a una concentración de McFarland 2.0.

2.3.2.3. Determinación de ácido láctico en el proceso de la fermentación

2.3.2.3.1. Estandarización de una disolución de NaOH 0.1 N

Se preparó una solución de NaOH 0.1N para la cual se pesó 4 g de NaOH y se disolvió con agua destilada en un matraz aforado de 1000 mL. Para estandarizar la solución de NaOH 0.1 N, se trabajó con ftalato ácido de potasio. Éste fue secado en la estufa BIOBASE a 110°C durante 2 horas y enfriado en desecador previamente.

Después, se disolvió 0.05 g en 50 ml de agua destilada y posteriormente se añadió 2 gotas de fenolftaleína al 1%. Lentamente y con agitación, se dejó caer el NaOH desde la bureta hasta adquirir una coloración persistente de rosa grosella.

Finalmente, el volumen gastado fue registrado para calcular el factor F de la disolución, aplicando la Ecuación 2. Este procedimiento se realizó por duplicado.

$$F = \frac{N_{exact.}}{N_{aprox}} = \frac{a*1000}{E_q*V*0.1} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

- a= g pesados de ftalato ácido de potasio
- E_q = peso equivalente de ftalato ácido de potasio (204.22)
- V= volumen (mL) de NaOH 0.1N gastados en la valoración

Seguido de ello, calculamos la normalidad exacta de la disolución utilizando la Ecuación 3.

$$N_{exacta} = 0.1 * F \quad \text{Ecuación 2}$$

2.3.2.3.2. Determinación de pH

El valor de pH durante la fermentación del ácido láctico se determinó recolectando 1 g de muestra de cada grupo de estudio y disolviéndolas en 100 mL de agua destilada. Las porciones disueltas se agitaron durante 10 min a 250 rpm en el Shaker DLAB. Después de la sedimentación, la porción líquida se midió a través en el potenciómetro OHAUS, Starter 3100M con el electrodo de pH estándar.

2.3.2.3.3. Determinación de ácido láctico

Para determinar el ácido láctico se pesó 1 g de muestra del material fecal simulado y se agrega agua destilada hasta el volumen de 100 mL, después se homogeniza durante 10 min en el Shaker DLAB a 250 rpm. Después se agrega fenolftaleína al 1% (2 gotas) seguidamente, se titula con NaOH al 0.1N

hasta obtener un cambio de coloración a rosa grosella que se mantendrá por 30 segundos. Se reportará la acidez expresada en % de ácido láctico (1 mL NaOH 0.1 N= 0.09 g de ácido láctico) utilizando la Ecuación 4. Para este procedimiento se ensambló un sistema como se muestra en la Figura 7.

$$\% \text{ acidez titulable} = \frac{G \cdot N \cdot F}{m} * 100$$

Ecuación 3

Donde:

- G: gasto de NaOH en la titulación (mL)
- N: normalidad de NaOH
- m: muestra diluida (g)
- F: factor de conversión del ácido láctico igual al 0.09



Figura 7. Sistema usado para la determinación de ácido láctico

2.3.3. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA MATERIA FECAL SIMULADA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE *Lactobacillus casei*

2.3.3.1. Evaluación del crecimiento de *Escherichia coli*.

Se realizó el recuento de *Escherichia coli* usando MC-Media Pad EC. Se pesó 1 g de muestra en frascos de tapa rosca estériles, después se mezcla con 100 mL agua destilada y se agitó por 10 minutos a 250 rpm en el Shaker DLAB. Se realiza la siembra utilizando 1000 μ L de muestra realizando las diluciones necesarias, se inoculó en la almohadilla del MC-Media Pad EC de manera homogénea, se llevó a la incubadora de convección natural 55 L INCUCCELL, ECO line a 37°C por 24 horas. Al terminar el tiempo de incubación, se realizó la lectura. La presencia de *Escherichia coli* fue de colonias de color morado debido a la β -glucuronidasa específica. Los resultados fueron expresados en UFC/g. El crecimiento de colonias debe ser <300 UFC/Pad, de ser mayor se recomienda hacer diluciones.

2.3.3.2. Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei*

Se pesó 1 g de muestra, la cual se mezcló con agua tamponada peptonada hasta el volumen de 100 mL, se agitó por 10 min en shaker DLAB a 250 rpm. La siembra se realizó usando la técnica de extensión en placa, para ello se tomó 10 μ L de las muestras diluidas y se sembraron por el método de superficie en la placa de agar MRS, seguidamente se extendió, utilizando el asa de Digrasky.

Después, las placas fueron llevadas a la incubadora de convección natural 55 L INCUCCELL a 37°C por 48 horas. Terminado el tiempo de incubación, se realizó la lectura utilizando un contador de colonias Tecnal. Los resultados serán expresados en UFC/g.

2.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de pH y porcentaje de ácido láctico después de la fermentación fueron analizados mediante el uso de ANOVA de una vía con un intervalo de confianza del 95 %. Así mismo, se aplicó la prueba de significancia honesta de Tukey para comparar medias entre los tratamientos utilizando el software Minitab.





CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DE MATERIA FECAL SIMULADA

Después de revisar distintos trabajos de investigación donde los autores muestran diferentes composiciones para la elaboración de materia fecal simulada, se realizó un resumen de ellas, como se muestra en la Tabla 15. Todas las recetas contenían proteínas, carbohidratos, lípidos y carga bacteriana en su composición.

De acuerdo con las recetas propuestas por Penn et. al, Miller et. al y Colon et., se elaboró una receta adaptada a las condiciones del presente estudio (ver Tabla 16) (59). Para la elaboración se utilizó celulosa microcristalina como fuente de fibra y carbohidratos; la cáscara de Psyllium, que da la fibra dietética, carbohidratos y la retención de agua; el contenido lipídico es representado por el ácido oleico; los minerales están representados por NaCl y KCl.

En la elaboración de las heces simuladas, se utilizó harina de soya como fuente de proteína que contiene 35.9% proteína, 23.7% grasas y 4.86% fibra, reemplazando la pasta miso (proteína) que es una pasta tradicional japonesa de soja fermentada, elaborada a partir de soja, distintos granos como el arroz o cebada y finalmente utiliza un hongo llamado Koji (60). En la composición se utilizó 70% de agua.

En la literatura revisada, existen distintas composiciones de material simulado, cada uno con distintos propósitos de uso, así como en el área de la medicina (24), investigaciones involucradas con la forma de manejo y mantenimiento del sistema de alcantarillado (22,61) o como para el tratamiento saneamiento *in situ* (12,25,62).

Posteriormente, realizando pruebas preliminares, se observó que existía un crecimiento bacteriano adicional que podía influenciar en el desarrollo del proyecto, es por esta razón, que se reemplazó algunos productos que influían directamente en el crecimiento bacteriano.

Una vez elaborada la materia fecal simulada, se observa que presenta una consistencia según la escala de Bristol tipo 3, la cual describe que las heces deben de tener una consistencia tipo morcilla con grietas, consistencia considerada como normal (ver Figura 8)(23,63). Además, se utilizó *Escherichia coli* en la composición como microorganismo indicador, se realizó un cultivo inicial en el MC- PAD *E. coli* para comprobar la presencia de *Escherichia coli* en las heces fecales simuladas, obteniendo el crecimiento de colonias de color celeste que indican el crecimiento de estas como se muestra en la Figura 9. El crecimiento fue de $2.5 \cdot 10^7$ UFC/g de *E. coli*.



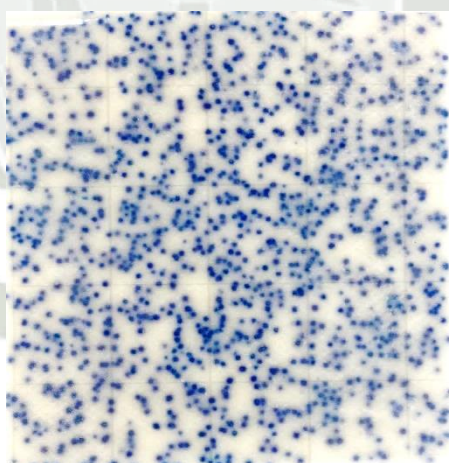
Figura 8. Heces fecales simuladas

Tabla 15. Composición de heces simuladas presentadas por distintos autores

Autores	Penn et al. (22)	Colon et al. y Miller et al. (12,48)	Wignarah et al. (25)	Kaba et al. (47)
Celulosa	10	10	15	33
Polietilenglicol			20	
Cáscara de Psyllium	17.5	17.5	5	
Torpulina				25
Escherichia coli			30	7
Levadura	0	30		
Extracto de levadura	30	0		
Caseína				10
Ácido Oleico	20	20		20
Pasta miso	17.5	17.5	5	
Inorgánicos			5	
KCl	2	2		2
NaCl	2	2		2
CaCl₂	1	1		1
Aceite de maní			20	
Material vegetal seco (mg)			50	

Tabla 16. Composición de materia fecal simulada para 100 g

Componente	Contenido (g)
Inóculo de <i>Escherichia coli</i>	30
Celulosa microcristalina	10
Cáscara de Psyllium	17.5
Harina de soya	17.5
Ácido oleico	20
NaCl	2.5
KCl	2.5

**Figura 9.** Concentración de *Escherichia coli* en las heces simuladas en Medio MC- Pad EC

3.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EN MATERIA FECAL SIMULADA UTILIZANDO DISTINTAS CONCENTRACIONES DE *Lactobacillus casei* ATTC 393.

3.2.1. Manipulación y preparación de cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATTC 25922 Y *Lactobacillus casei* ATCC 393

3.2.1.1. Activación de cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATTC 25922 Y

Lactobacillus casei ATCC 393

Se muestra en la Figura 10 (a) el crecimiento de *Escherichia coli* en agar Mac Conkey después de 24 horas de incubación a 37°C presentándose colonias de color rosado, en agar nutritivo como se observa en la Figura 10(b), el crecimiento de *Escherichia coli* de color blanquecino, se utilizó el agar nutritivo para poder replicar la bacteria en otras placas y evitar la contaminación en las placas originales de crecimiento de activación. El crecimiento de *Lactobacillus casei* se observa en la Figura 10(c) en agar MRS observándose un crecimiento elevado de estas colonias de color blanco. Luego de la activación de las cepas, se realizaron subcultivos para evitar la contaminación de las placas de cultivos principales y así poder manipular las bacterias en la experimentación. Después de realizar el cultivo de ambas bacterias se observa que el crecimiento entre ambas cepas es distinto, siendo *Lactobacillus casei* de crecimiento lento de 48 a 72 horas, mientras que *Escherichia coli* fue de 24 horas, observándose en los diversos medios que se utilizó en este proyecto como es el Medio nutritivo, Mac Conkey y MC media Pad EC.

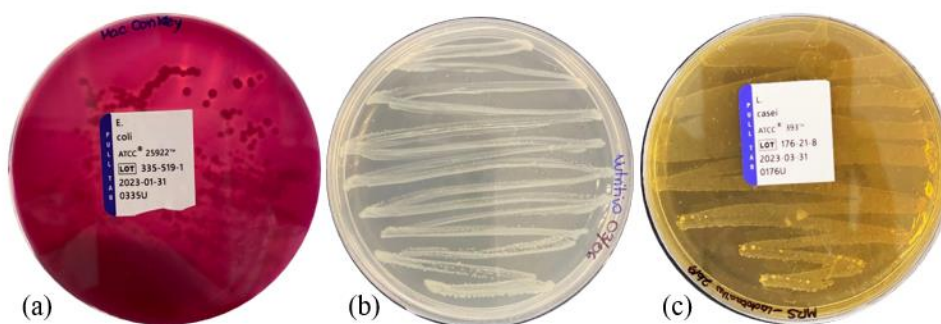


Figura 10. a) Crecimiento en agar Mac Conkey de *Escherichia coli*
(b) Crecimiento en agar Nutritivo de *Escherichia coli* (c) Crecimiento en agar
Man Rogosa y Sharpe de *Lactobacillus casei* (MRS)

3.2.1.2. Caracterización de las cepas

A. Caracterización macroscópica

A partir de las placas subcultivadas se describe las características macroscópicas del crecimiento de *Escherichia coli* en agar Mac Conkey en la Tabla 17, observando el crecimiento de colonias color de rosado de forma circular con un halo turbio debido a la utilización de la lactosa presente en el agar como se muestra en la Figura 11.

Tabla 17. Descripción macroscópica del *Escherichia coli*

Características	Resultado
Forma	Circular
Tamaño	1-2 mm
Color	Rosado
Lustre	Opaco
Superficie	Plana

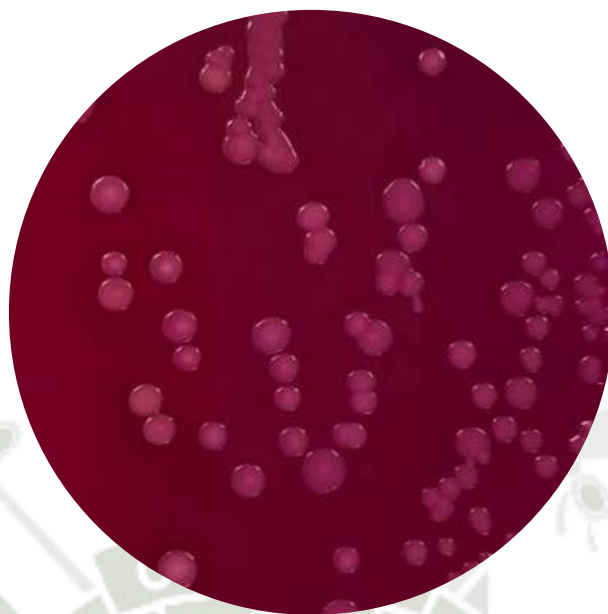


Figura 11. Observación macroscópica de *Escherichia coli* en agar Mac Conkey

Como se resume en la Tabla 18. Las colonias de *Lactobacillus casei* en agar Man Rogosa y Shape (MRS) son de forma circular, de color blanquesino, de tamaño de 1-2 mm como se observa en la Figura 12.

Tabla 18. Descripción macroscópica del *Lactobacillus casei*

Características	Resultado
Forma	Circular
Tamaño	1-2 mm
Color	Blanco
Lustre	Brillante
Superficie	Elevada
Elevación	Convexa

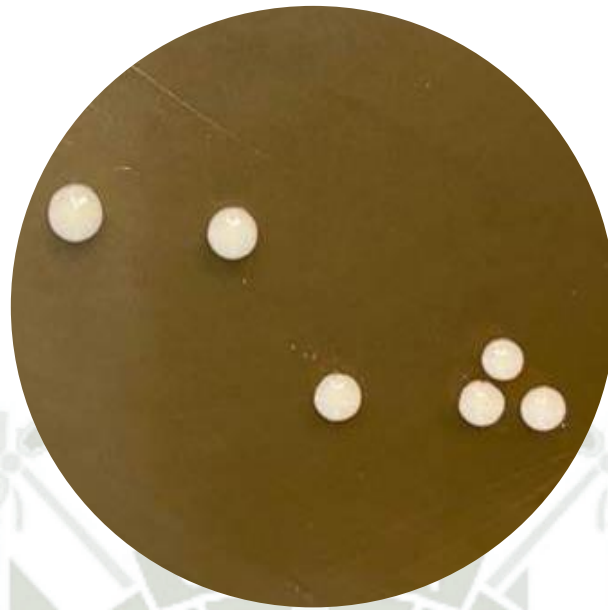


Figura 12. Observación macroscópica de *Lactobacillus casei* en agar MRS

B. Caracterización microscópica

Posteriormente, después de realizar la tinción Gram en la Figura 13 se puede observar a la *Escherichia coli* en forma de bacilo, sin formar esporas de color rosado tratándose de una bacteria Gram negativa, caracterizada por presentar una pared celular con una capa delgada de peptidoglicano. A diferencia, en la Figura 14 se presenta *Lactobacillus casei* teñidas de color violeta identificándose como una bacteria Gram positiva caracteriza por tener pared celular con una capa gruesa de peptidoglicano. Además, *Lactobacillus casei* resultó catalasa negativa.

Finalmente, en la Tabla 19 se detalla las diferencias microscópicas entre ambas cepas.

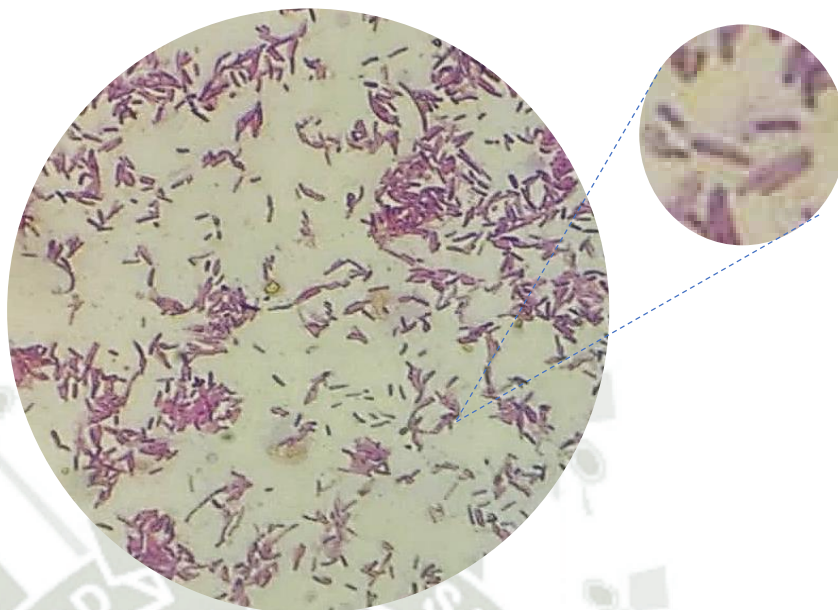


Figura 13. Observación microscópica de *Escherichia coli* a 100X

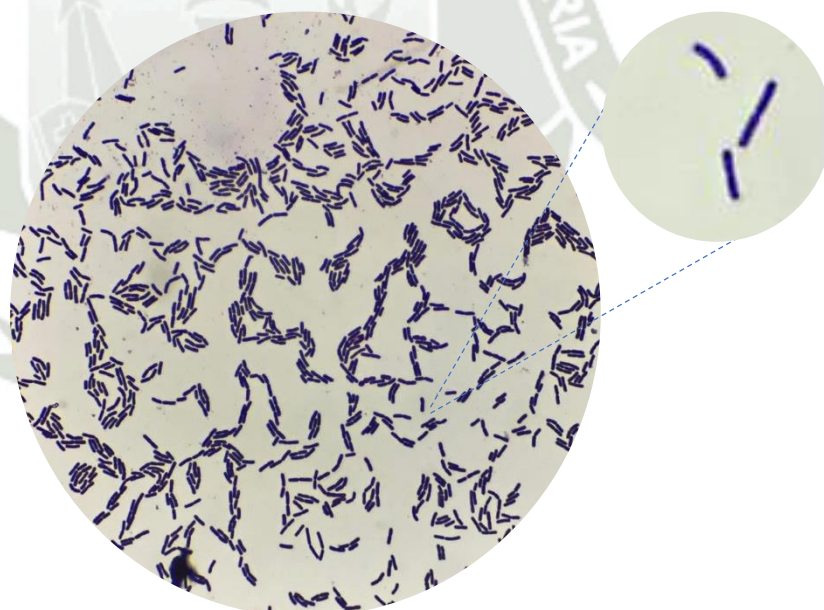


Figura 14. Observación microscópica de *Lactobacillus casei* a 100X

Tabla 19. Comparación de características microscópicas entre *Escherichia coli* y

Lactobacillus casei

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
Forma	Bacilo	Bacilo
Tinción Gram	Negativo	Positivo
Color	Rosado	Morado

3.2.1.3. Escala McFarland

La Figura 15 muestra la curva de calibración que relaciona en el eje x la concentración expresada en unidades formadoras de colonias (UFC) con la absorbancia en el eje y.

Se aplicó el modelo de regresión lineal, donde se obtuvo la **Ecuación 4**.

$$y = 5E-10x + 0.0509$$

Ecuación 5

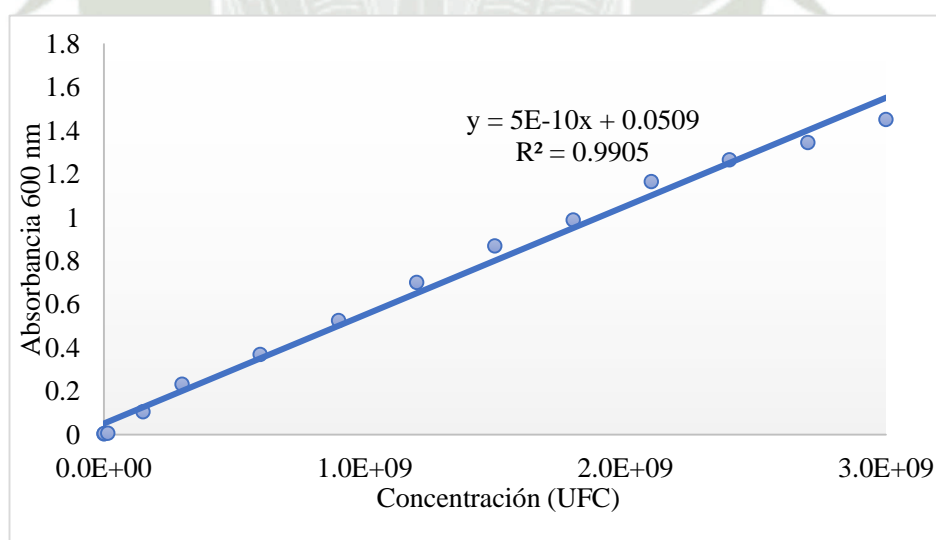


Figura 15. Curva de McFarland

El coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.9905, el cual es comparable con el rango de $R^2 = 0.904-0.998$, además este valor es muy cercano a la unidad, siendo 1 el mayor valor de correlación para este tipo de gráficas.

3.2.1.4. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei*

Terminada la activación y caracterización de *Lactobacillus casei*, se realizó una cinética de crecimiento evaluando las temperaturas (ambiente, 37 y 42°C) mediante espectrofotometría durante 5 días. A partir de las absorbancias obtenidas, se utilizó la ecuación 5 para encontrar las UFC/mL y finalmente obtener la curva de crecimiento del *Lactobacillus casei* en escala logarítmica como se observa en la Figura 16 que muestra la fase de crecimiento exponencial desde las 0 horas hasta las 8 horas aproximadamente. Luego de este tiempo, el cultivo entra en un estado estacionario con crecimiento prolongado, donde se observa que el crecimiento de *Lactobacillus casei* a 37°C y 42°C tienen mucha semejanza en tiempo y número de crecimiento y existe una ligera diferencia con el crecimiento de *Lactobacillus casei* a temperatura ambiente que tiene mayor crecimiento de números de bacterias.

La fermentación ácido láctica depende de la fase del crecimiento en que se encuentre el *Lactobacillus casei*, es por esta razón que el inóculo a temperatura ambiente es la que se eligió en el presente estudio (64).

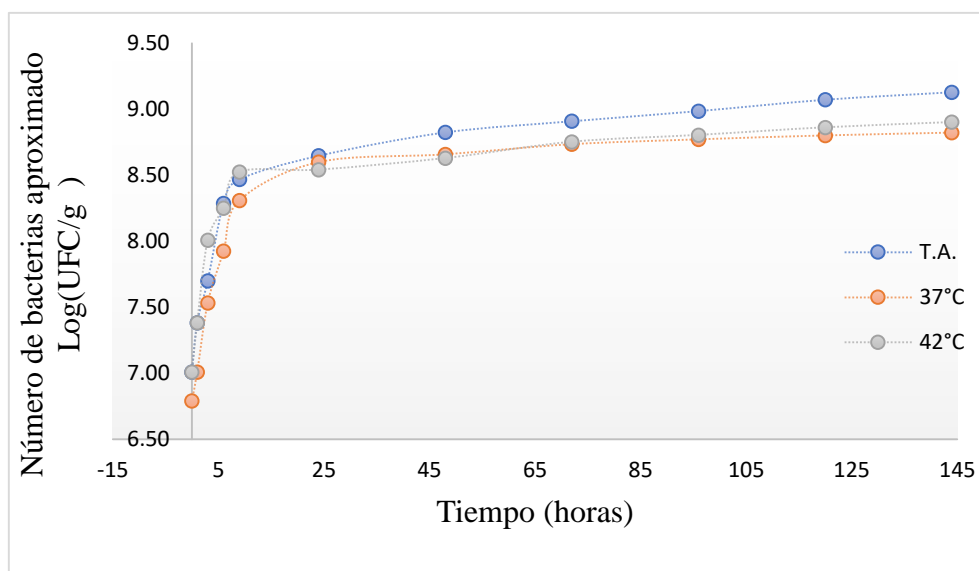


Figura 16. Curva del crecimiento bacteriano de *Lactobacillus casei* ATTC 393 a diferentes temperaturas

3.2.2. Configuración experimental de fermentación ácido láctica en materia fecal simulado

De acuerdo con la curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* obtenida anteriormente, se realizó la fermentación a temperatura ambiente durante 10 días. Después se configuró la experimentación según la Tabla 14, utilizando un precultivo de *Lactobacillus casei* a una concentración aproximada de $6.0 \cdot 10^8$ UFC/mL.

3.2.3. Determinación del ácido láctico en la fermentación

Para la determinación del ácido láctico se tenía que conocer la verdadera normalidad del NaOH 0.1N, para lo cual se estandarizó dicha solución por duplicado. En la Tabla 20 se observa los datos necesarios como los gramos utilizados de Ftalato ácido de potasio y el volumen gastado de NaOH, datos necesarios para poder aplicar la ecuación 2 y posteriormente la ecuación 3 y obtener la normalidad exacta.

Finalmente se realizó un promedio de los duplicados y se obtuvo la verdadera normalidad de NaOH que se usará en los ensayos de acidez láctica en la experimentación. Durante los 10 días de experimentación, se midió el pH y se determinó el ácido láctico por triplicado al grupo control y los 3 grupos de estudio.

Tabla 20. Datos para estandarización de una disolución de NaOH 0.1N

Repetición	Ftalato ácido de potasio (g)	Volumen de NaOH gastado (mL)	N real
1	0.0505	2.55	0.09697
2	0.0504	2.55	0.09678
Promedio			0.096875

Se realizó un análisis de varianza con nivel de significancia de 0.05 del porcentaje de acidez láctica obtenido durante los 10 días de análisis de los 3 grupos de estudio mostrado en la Tabla 21, en la cual el valor p es menor 0.05, obteniendo una hipótesis alterna donde se observa que al menos un grupo de estudio es diferente. Además, se observó que las medias no eran iguales por lo que se confirma una hipótesis alterna.

Asimismo, se realizó el análisis de Tukey mostrado en la Tabla 22, utilizado para comparar la producción de ácido láctico en los distintos grupos de estudio, donde se muestra que el promedio de producción de ácido láctico del grupo 2 (10 % de *Lactobacillus casei*) respecto al grupo 3 (20% de *Lactobacillus casei*) no existe diferencia significativa.

Demostrando que el uso mínimo de 10% de *Lactobacillus casei* sería efectiva para la inhibición de patógenos y para obtener la producción mayor de 3% de ácido láctico.

Tabla 21. Análisis de varianza del porcentaje de acidez obtenido durante 10 días de estudio a distintas concentraciones de *L. casei*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	6.779	3.3897	4.18	0.025
ERROR	30	24.322	0.8107		
Total	32	31.101			

Tabla 22. Análisis por el método de Tukey

Factor	N	Media	Agrupación
20.00%	11	2.422	A
10.00%	11	2.281	A B
5.00%	11	1.398	B

La Figura 17 muestra el diagrama de caja y bigotes de los 3 grupos de estudio en las distintas concentraciones de *Lactobacillus casei* 5%, 10% y 20% respectivamente. El valor máximo de producción del ácido láctico para el grupo de estudio 1 fue de 1.74, para el grupo 2, de 3.28 y para el grupo 3 fue 3.35. Así mismo, el diagrama muestra que las cajas de los grupos 2 y 3 (10 y 20%) se encuentran a la misma altura por lo que se puede decir que la producción de ácido láctico es igual para ambos casos de estudio, además, ambos grupos de estudios tienen una mediana de producción de ácido láctico de 2.28 y 2.42, respectivamente.

Asimismo, se observa que el mayor porcentaje de datos se encuentran en el cuartil 2 para los 3 grupos de estudio, donde el grupo 2 presenta más variabilidad de datos.

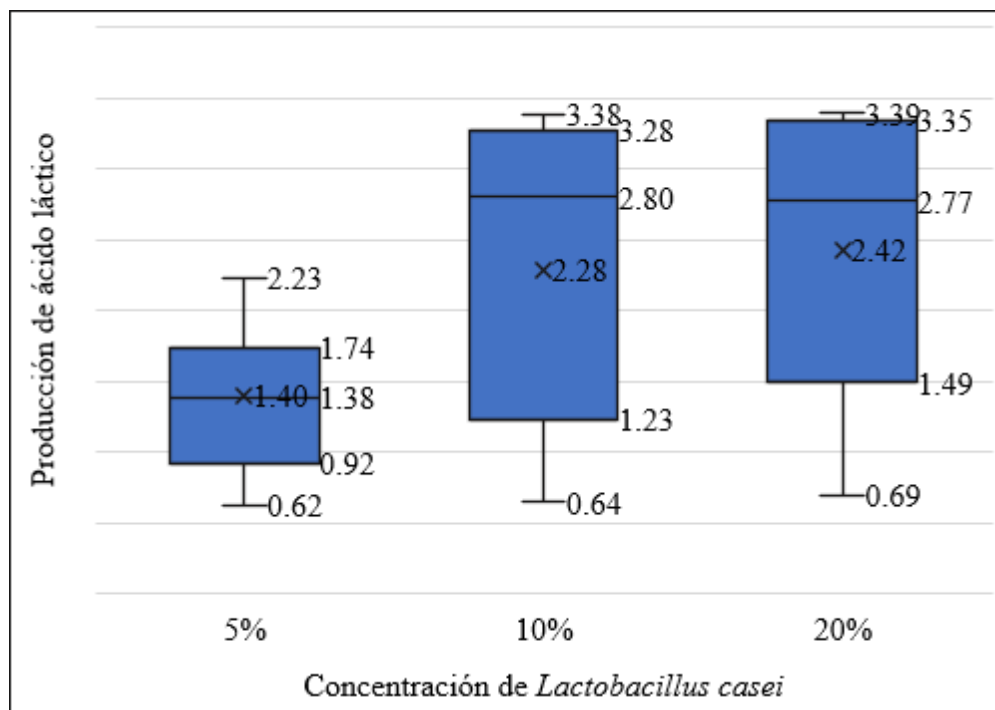


Figura 17. Diagrama de caja de bigotes del efecto de la concentración de *Lactobacillus casei* en la producción de Ac. Láctico

En este estudio, la melaza al 15% y *Lactobacillus casei* ATCC 393 en concentración de McFarland 2.0 fueron capaces de fermentar la materia fecal simulada formando de ácido láctico y capaz de reducir el pH.

En la Figura 18 se observa los valores del pH de la fermentación y su comportamiento diario durante los 10 días de duración del tratamiento, además se observa el pH del tratamiento inició en el día 0 con un valor promedio de 6.85 en el control y en los 3 distintos grupos.

El grupo control en el día 10 obtiene un valor de 6.91 siendo este valor cercano al primer día. El grupo 2 es un grupo intermedio que termina la fermentación con un valor de 5.25, mientras que el grupo 3 y 4 se estabilizan con valores inferiores al 4.1 a partir del día 5, donde se puede observar una caída de pH.

Investigaciones anteriores utilizaron diferentes concentraciones de *Lactobacillus casei* para la producción de ácido láctico reportando que la producción se realiza en un periodo de 10 a 30 días (26,28). Las bacterias ácidas lácticas como es el caso de *Lactobacillus casei* necesitan nutrientes como aminoácidos, nitrógeno para crecer (65) que están presentes en la materia fecal real y en la que se simuló en este estudio, además la adición de un sustrato acelera la fermentación ácido láctico como en este estudio se utilizó la melaza, que contiene azúcares fermentables (26).

La influencia del sustrato utilizado, en este caso melaza, mostrado en otras investigaciones como Masis et. al (26) quien ya había realizado la importancia de la presencia de un sustrato y de bacterias ácido lácticas, en su estudio utiliza 20% p%p de melaza para llegar a un pH menor de 4.0. Odey obtuvo pH finales de 5.4 y 3.9 en una fermentación de tres semanas utilizando harina de yuca fermentada y harina de arroz fermentada.(18,31). Así mismo, el uso de la melaza de caña de azúcar como Yemaneh et al.(17), quien utiliza 5 y 10%, quien demostró la disminución de la concentración de *E. Coli* a límites no detectables después de 21 días de fermentación

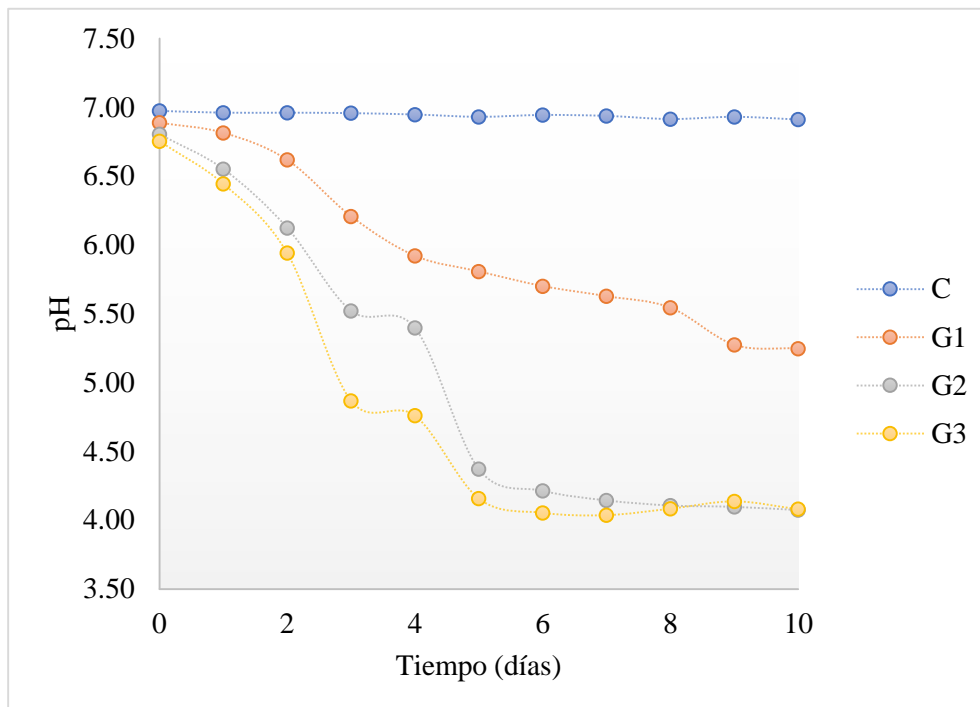


Figura 18. pH durante 10 días de fermentación

3.3. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA MATERIA FECAL SIMULADA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE *Lactobacillus casei*

Escherichia coli fue utilizada como marcador de patógeno para la reducción y desinfección de las heces fecales simuladas. La evaluación del crecimiento de *Escherichia coli* se realizó cada 3 días en este estudio, el valor promedio inicial del *Escherichia coli* fue de $2.55 \cdot 10^7$ UFC/g. Los resultados en la Tabla 23 muestran que el grupo control constituido por material fecal simulado y melaza mantuvo un crecimiento contante que empezó con una concentración de $2.1 \cdot 10^7$ UFC/g de *E. coli* y después de los 10 días de estudio el crecimiento fue de $8 \cdot 10^7$ UFC/g de *E. coli*.

Los grupos 2, 3 y 4, lo cuales, tuvieron adición de diferentes concentraciones de *Lactobacillus Casei* ATTC 393 en 5,10 y 20 % respectivamente, presentaron inhibición del crecimiento de *E. coli* como la reducción de este. En el grupo 2 presento una reducción llegando a un valor de $1.6 \cdot 10^6$ UFC/g. En el grupo 3 y 4 la reducción de *E. coli* fue drásticamente a partir del día 6 llegando a límites No Detectados. Existen investigaciones previas destinados a reducir la presencia de patógenos en muestras como heces fecales reales y simuladas, lodos fecales y efluentes.

Algunos utilizan la fermentación ácido láctica, otros utilizan la cal (26), o como describe Mamera et. al (66), quien utiliza biocarbón como tratamiento para la gestión de lodos fecales presentando una eliminación de 89 y 98% de bacterias. Asimismo, Andreev et al. (8) realiza una fermentación durante 10 días logrando la reducción de patógenos combinando con compostaje y usando biocarbón. La fermentación ácido láctica usada en este estudio es para tratamiento y con un enfoque de saneamiento para baños portátiles, por lo que diversos estudios contribuyen en la reducción de patógenos como lo muestra Scheinmann et al.(28) y Yemaneh et. al (17), de igual forma Odey et al(18) reduce debajo del límite de detección (menor de 10^3 UFC/100 mL) después de 15 a 17 días e inclusive 21 días

En la Tabla 23 se observa cuantitativamente el crecimiento del *Escherichia coli* durante el estudio, mientras que, en la Figura 19 se puede observar cualitativamente el crecimiento de las mismas muestras con diluciones e inoculadas en el MC- media Pad EC.

Se aprecia el crecimiento de *Escherichia coli* como colonias de color morado, en el día cero el recuento de *Escherichia coli* es parecido en todos los grupos de estudio incluyendo el control.

Tabla 23. Comportamiento *cuantitativo* de *Escherichia coli* durante 10 días de fermentación en UFC/g

Día	C	G1	G2	G3
0	$2.1 \cdot 10^7$	$2.8 \cdot 10^7$	$2.5 \cdot 10^7$	$2.8 \cdot 10^7$
3	$3.6 \cdot 10^7$	$2.5 \cdot 10^7$	$1.54 \cdot 10^7$	$8.93 \cdot 10^6$
6	$3.8 \cdot 10^7$	$1.04 \cdot 10^7$	ND	ND
9	$8.0 \cdot 10^7$	$1.6 \cdot 10^6$	ND	ND

ND: No detectado

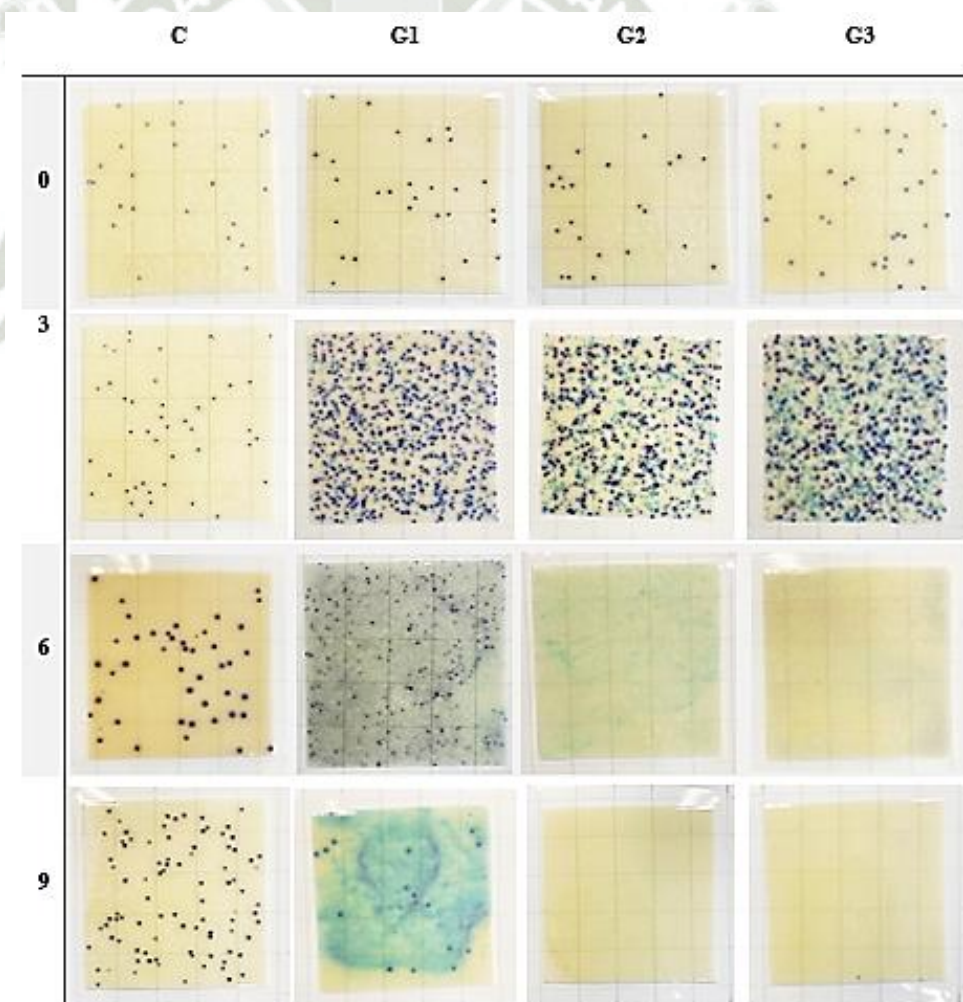


Figura 19. Evaluación del comportamiento de *Escherichia coli* en MC- media Pad durante la fermentación ácida láctica.

Posteriormente como se observa en la Figura 20 el crecimiento de *Escherichia coli* en el grupo control aumenta mientras que en los grupos de estudio que contenía *Lactobacillus casei* disminuía, en el día 3 se puede observar el crecimiento de colonias de color celeste en los grupos de estudio 2 y 3 que se puede atribuir a una contaminación o al cambio de pH que están presentando las bacterias que posteriormente a partir del día 6 en los grupos 2 y 3 hubo una reducción de *Escherichia coli* al 100%, no observándose crecimiento en los PAD inoculados.

En el estudio también fue evaluado el comportamiento de *Lactobacillus casei*. La bacteria de *Escherichia coli* en la materia fecal simulada, en presencia de 10 y 20% *L. casei* después de 10 días de fermentación llegó a su reducción mientras que el comportamiento del *Lactobacillus* durante el mismo tiempo no tiene un comportamiento preciso ni constante.

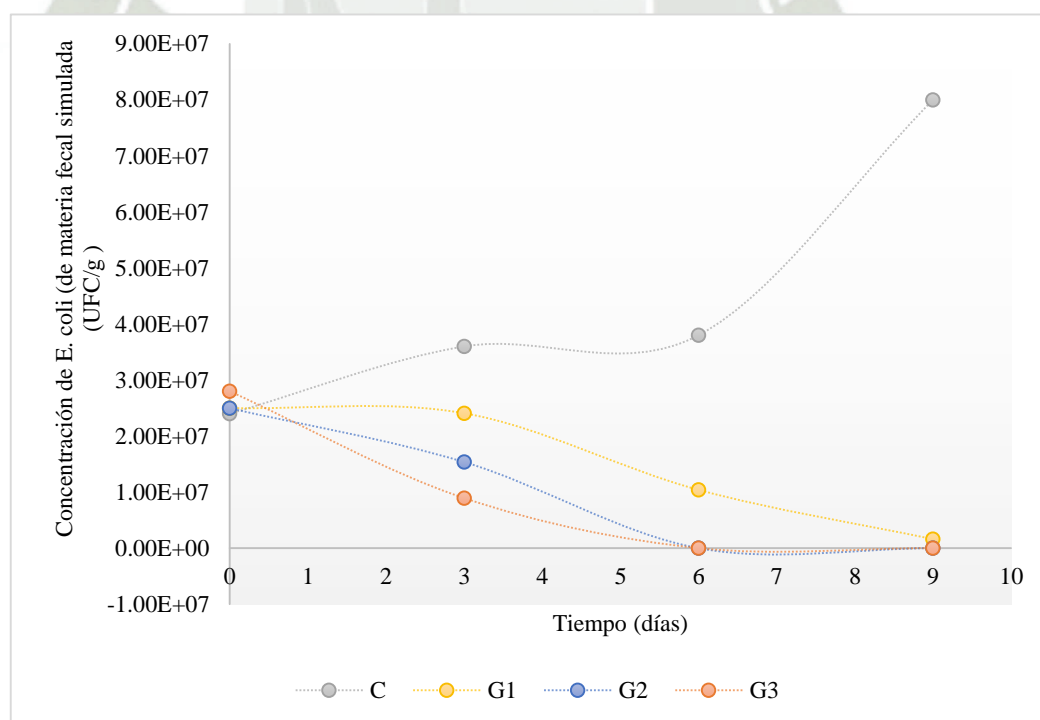


Figura 20. Evaluación del comportamiento de *Escherichia coli* expresado en (UFC/g) durante la fermentación.

En la Tabla 24 se puede observar cuantitativamente la concentración de *L. casei* cultivado en agar MRS durante el proceso de fermentación y evaluado cada 3 días. Se utilizó un grupo control, el cual no tuvo adición de inóculo de *L. casei*, mientras que el grupo 1, 2 y 3 tuvieron 5, 10 y 20 % de inóculo de *L. casei*.

Tabla 24. Evaluación del comportamiento de *Lactobacillus casei* durante 10 días de fermentación expresados en UFC/g

Día	C	G1	G2	G3
0	ND	$3.1 \cdot 10^9$	$5.1 \cdot 10^9$	$1.2 \cdot 10^{10}$
3	ND	$1.0 \cdot 10^9$	$4.6 \cdot 10^9$	$9.8 \cdot 10^9$
6	ND	$3.8 \cdot 10^9$	$9.5 \cdot 10^9$	$1.48 \cdot 10^{10}$
9	ND	$1.3 \cdot 10^9$	$2.7 \cdot 10^9$	$5.9 \cdot 10^9$

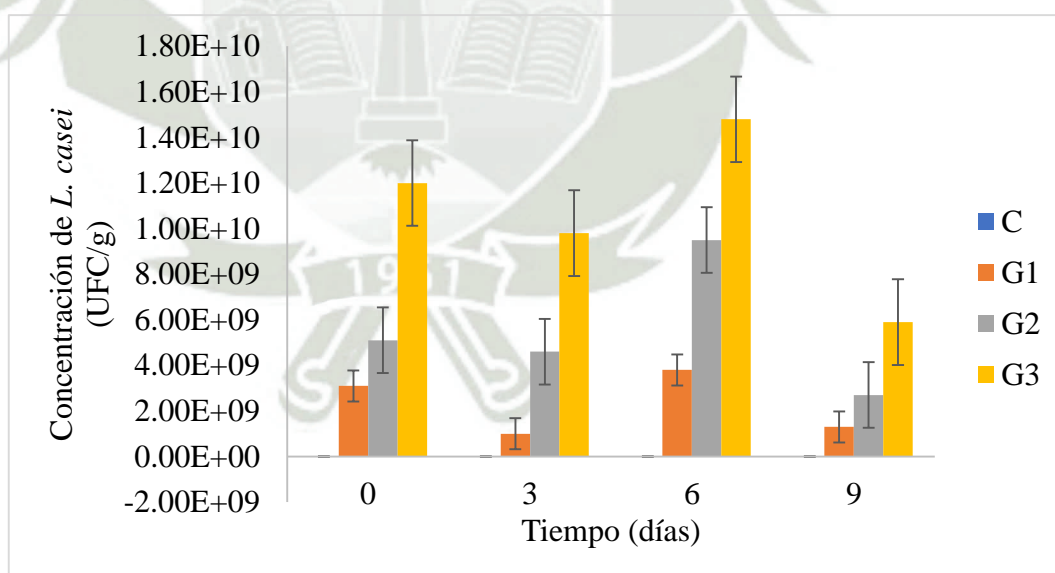


Figura 21. Evaluación del comportamiento de *Lactobacillus casei* expresado en UFC/g durante 10 días de fermentación.

Los resultados plasmados en la Figura 21 muestran que el crecimiento no es constante, pero se puede observar que en el día 6, tiene mayor crecimiento en los 3 grupos de estudio a diferencia del día 9 que presenta una clara disminución en el crecimiento. Este resultado lo relaciona a la producción máxima de ácido láctico, reducción de crecimiento de *E. coli* y disminución de pH, todos dados el día 6 de evaluación.



4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

PRIMERO, se formuló la composición para la elaboración de materia fecal simulada de acuerdo con formulaciones revisadas y adaptada a condiciones de laboratorio. La composición final contiene inóculo de *Escherichia coli*, celulosa microcristalina, cáscara de Psyllium, harina de soya, ácido oleico, NaCl y KCl.

SEGUNDO, se evaluó la producción de ácido láctico utilizando 0, 5, 10 y 20% de *Lactobacillus casei* ATTC 393 a una concentración aproximada de McFarland 2.0 durante 10 días en materia fecal simulada, obteniendo porcentajes mayores a 3.0 % de ácido láctico y valores de pH menores a 4.5 utilizando 10% y 20% de *Lactobacillus casei*. Por tanto, la hipótesis fue validada y utilizando mínimo el 10% de *Lactobacillus casei* obtendremos producción de ácido láctico.

TERCERO, se evaluó el comportamiento del *Escherichia coli* ATTC 25922 frente a las distintas concentraciones usadas de *Lactobacillus casei* ATTC 393 durante el proceso de fermentación de materia fecal simulada, observándose que hubo una inhibición de crecimiento en *Escherichia coli* a 0 UFC/g en los grupos de estudio 2 y 3 (10 y 20% de *Lactobacillus casei*).

4.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar la fermentación ácido láctica en materia fecal contaminada con indicadores como *Salmonella spp.* coliformes fecales, *Streptococos*, para poder ser aplicada en sistemas industriales de saneamiento.
- Se recomienda la evaluación de la fermentación ácido láctica de *Lactobacillus casei* en unidades de saneamiento portátiles como alternativa en los procesos de desinfección.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Strande L, Ronteltap M, Brdjanovic D. Faecal Sludge Management: Systems Approach for Implementation and Operation. Vol. 13. IWA publishing; 2014.
2. Mercer E, Usher SP, McAdam EJ, Stoner B, Bajón-Fernández Y. Rheological characterisation of synthetic and fresh faeces to inform on solids management strategies for non-sewered sanitation systems. *J Environ Manage.* el 15 de diciembre de 2021;300:113730.
3. Getaneh Z, G. Love N, Desta A, Nigussie A. Lactic acid from food waste enhances pathogen inactivation and urea stabilization in human urine . *International Journal of Water Resources and Environmental Engineering .* 2021;13(3):196–205.
4. Saxena S, Den W. In situ treatment technologies for pit latrines to mitigate groundwater contamination by fecal pathogens: a review of recent technical advances. *Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development.* el 1 de enero de 2022;12(1):102–15.
5. Saxena S, Ebrazibakhshayesh B, Dentel SK, Cha DK, Imhoff PT. Drying of fecal sludge in 3D laminate enclosures for urban waste management. *Science of The Total Environment.* el 1 de julio de 2019;672:927–37.
6. Naciones Unidas. Agua y saneamiento - Desarrollo Sostenible [Internet]. [citado el 12 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/water-and-sanitation/>

7. Agua y saneamiento - Desarrollo Sostenible [Internet]. [citado el 18 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/water-and-sanitation/>
8. Andreev N, Ronteltap M, Boincean B, Lens PNL. Lactic acid fermentation of human excreta for agricultural application. *J Environ Manage.* el 15 de enero de 2018;206:890–900.
9. Andreev N, Ronteltap M, Boincean B, Wernli M, Zubcov E, Bagrin N, et al. Lactic acid fermentation of human urine to improve its fertilizing value and reduce odour emissions. *J Environ Manage.* el 1 de agosto de 2017;198:63–9.
10. Guo S, Zhou X, Simha P, Mercado LFP, Lv Y, Li Z. Poor awareness and attitudes to sanitation servicing can impede China’s Rural Toilet Revolution: Evidence from Western China. *Science of the Total Environment.* el 10 de noviembre de 2021;794.
11. Perú: Formas de Acceso al Agua y Saneamiento Básico [Internet]. Lima; 2020 jun [citado el 12 de agosto de 2022]. Disponible en: https://m.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/boletines/boletin_agua_junio2020.pdf
12. Colón J, Forbis-Stokes AA, Deshusses MA. Anaerobic digestion of undiluted simulant human excreta for sanitation and energy recovery in less-developed countries. *Energy for Sustainable Development.* el 1 de diciembre de 2015;29:57–64.

13. Rose C, Parker A, Jefferson B, Cartmell E. The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. *Crit Rev Environ Sci Technol.* el 2 de septiembre de 2015;45(17):1827.
14. Afolabi OOD, Sohail M. Microwaving human faecal sludge as a viable sanitation technology option for treatment and value recovery – A critical review. *J Environ Manage.* el 1 de febrero de 2017;187:401–15.
15. Anderson C, Malambo DH, Perez MEG, Nobela HN, de Pooter L, Spit J, et al. Lactic acid fermentation, urea and lime addition: Promising faecal sludge sanitizing methods for emergency sanitation. *Int J Environ Res Public Health.* el 29 de octubre de 2015;12(11):13871–85.
16. Gold M, Harada H, Therrien JD, Nishida T, Cunningham M, Semiyaga S, et al. Cross-country analysis of faecal sludge dewatering. *Environ Technol.* el 2 de diciembre de 2018;39(23):3077–87.
17. Yemaneh A, Bulbo M, Schmale C, Otterpohl R. Investigation of Low-Cost Sugar Supplement for Lactic Acid Fermentation in Terra Preta Sanitation System. *Terra Preta Sanitation* . 2014;
18. Odey EA, Li Z, Zhou X, Yan Y. Locally produced lactic acid bacteria for pathogen inactivation and odor control in fecal sludge. *J Clean Prod.* el 20 de mayo de 2018;184:798–805.

19. Odey EA, Li Z, Zhou X, Yan Y. Optimization of lactic acid fermentation for pathogen inactivation in fecal sludge. *Ecotoxicol Environ Saf.* el 15 de agosto de 2018;157:249–54.
20. Andreev N, Ronteltap M, Boincean B, Lens PNL. Treatment of Source-Separated Human Feces via Lactic Acid Fermentation Combined with Thermophilic Composting. *Compost Sci Util.* el 2 de octubre de 2017;25(4):220–30.
21. Jurga A, Janiak K, Ratkiewicz K, Podstawczyk D. An overview of blackwater data collection from space life support systems and its comparison to a terrestrial wastewater dataset. *J Environ Manage.* el 1 de julio de 2019;241:198–210.
22. Penn R, Ward BJ, Strande L, Maurer M. Review of synthetic human faeces and faecal sludge for sanitation and wastewater research. *Water Res.* el 1 de abril de 2018;132:222–40.
23. Martinez AP, De Azevedo GR. Traducción, adaptación cultural y validación de la “Bristol Stool Form Scale” Artículo Original. *Rev Latino-Am Enfermagem.* 2012;20(3).
24. Lewis SJ, Heaton KW. Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit Time. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(9), 920–924 | 10.3109/00365529709011203. *Scand J Gastroenterol.* el 8 de julio de 2009;32(9):920–4.
25. Wignarajah K, Litwiller E, Fisher JW, Hogan J. Simulated human feces for testing human waste processing technologies in space systems. *SAE Technical Papers [Internet].* 2006 [citado el 15 de

agosto de 2022]; Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/285432442_Simulated_Human_Feces_for_Testing_Human_Waste_Processing_Technologies_in_Space_Systems

26. Masís-Meléndez F, Segura-Montero F, Quesada-González A. Control of septage sanitization by limes and lactic acid fermentation. *J Environ Manage.* el 1 de junio de 2021;287:112203.
27. Victoria NS, Sree Devi Kumari T, Lazarus B. Assessment on impact of sewage in coastal pollution and distribution of fecal pathogenic bacteria with reference to antibiotic resistance in the coastal area of Cape Comorin, India. *Mar Pollut Bull.* el 1 de febrero de 2022;175:113123.
28. Scheinemann HA, Dittmar K, Stöckel FS, Müller H, Krüger ME. Hygienisation and Nutrient Conservation of Sewage Sludge or Cattle Manure by Lactic Acid Fermentation. *PLoS One.* el 18 de marzo de 2015;10(3):e0118230.
29. Larrea-Murrell JA, Rojas-Badía MM, Rojas-Hernández M, Heydrich-Pérez M. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* el 11 de mayo de 2013;44(3):24–34.
30. Farooq U, Muhammad Anjum F, Zahoor T, Rahman S, Randhawa M, Ahmed DA, et al. Optimization of lactic acid production from

- cheap raw material: sugarcane molasses. Pak J Bot. 2012;44(1):333–8.
31. Ghaffar T, Irshad M, Anwar Z, Aqil T, Zulifqar Z, Tariq A, et al. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. J Radiat Res Appl Sci. abril de 2014;7(2):222–9.
32. Alves de Oliveira R, Komesu A, Vaz Rossell CE, Maciel Filho R. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. Biochem Eng J. el 15 de mayo de 2018;133:219–39.
33. Garcia Carlos A., Arrázola Guillermo S., Durango Alba M. Biotechnological production of lactic acid. Temas Agraros. diciembre de 2010;15(2):9–26.
34. Fidan H, Esatbeyoglu T, Simat V, Trif M, Tabanelli G, Kostka T, et al. Recent developments of lactic acid bacteria and their metabolites on foodborne pathogens and spoilage bacteria: Facts and gaps. Food Biosci. el 1 de junio de 2022;47:101741.
35. Özcelik S, Kuley E, Özogul F. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. LWT. el 1 de noviembre de 2016;73:536–42.
36. Soewondo P, Febriana A, Handajani M, Firdayati M. Faeces treatment by lactic fermentation process and future perspectives of terra preta sanitation concept in Indonesia. Terra Preta Sanitation. 2014;

37. Odey EA, Odey JA, Li Z, Zhou X. A lab-scale study on the influence of the compost-dewatering process on moisture removal and pathogen inactivation in pre-sanitized fecal sludge. *Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development*. el 1 de marzo de 2022;12(3):329–35.
38. Bettendorf T, Stoeckl M, Otterpohl R. Vermicomposting of municipal solid organic waste and fecal matter as part of Terra Preta Sanitation-a process and product assessment. 2014.
39. Vijayakumar J, Aravindan R, Viruthagiri T. Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid. *Chem Biochem Eng Q*. el 24 de junio de 2008;22(2):245–64.
40. O’Sullivan DJ, Kim YT, Lee JH. Lactic Acid Bacteria: Genomics and Genetic Engineering. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Third edition*. el 1 de enero de 2022;4:168–80.
41. Liu JM, Solem C, Lu T, Jensen PR. Harnessing lactic acid bacteria in synthetic microbial consortia. *Trends Biotechnol*. el 1 de enero de 2022;40(1):8–11.
42. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. el 15 de abril de 2020;70(4):2782–858.

43. Ashaolu TJ, Reale A. A Holistic Review on Euro-Asian Lactic Acid Bacteria Fermented Cereals and Vegetables. *Microorganisms* 2020, Vol 8, Page 1176. el 3 de agosto de 2020;8(8):1176.
44. Sedó Molina GE, Shetty R, Xiao H, Wätjen AP, Tovar M, Bang-Berthelsen CH. Development of a novel lactic acid bacteria starter culture approach: From insect microbiome to plant-based fermentations. *LWT*. el 15 de septiembre de 2022;167:113797.
45. Meng F, Zhao M, Lu Z. The LuxS/AI-2 system regulates the probiotic activities of lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol*. el 1 de septiembre de 2022;127:272–9.
46. Punia Bangar S, Suri S, Trif M, Ozogul F. Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Biosci*. el 1 de abril de 2022;46:101615.
47. Kaba L, Hitchens GD, Bockris JO. Electrochemical Incineration of Wastes. *J Electrochem Soc*. el 1 de mayo de 1990;137(5):1341–5.
48. Miller A, Espanani R, Junker A, Hendry D, Wilkinson N, Bollinger D, et al. Supercritical water oxidation of a model fecal sludge without the use of a co-fuel. *Chemosphere*. el 1 de diciembre de 2015;141:189–96.
49. Teramura H, Ogura A, Everis L, Betts G. MC-Media Pad EC for Enumeration of Escherichia coli and Coliforms in a Variety of FoodsAOAC Performance Tested MethodSM 011902. *J AOAC Int*. el 1 de septiembre de 2019;102(5):1502–15.

50. Microbiologics Inc. Instrucciones de uso KWIK-STIK [Internet]. Minnesota; Disponible en: www.microbiologics.com
51. Nanthini Sahaya V, Devi Kumari TS, Bakthasingh L. Assessment on impact of sewage in coastal pollution and distribution of fecal pathogenic bacteria with reference to antibiotic resistance in the coastal area of Cape Comorin, India. *Mar Pollut Bull.* el 1 de febrero de 2022;175:113123.
52. Casasola Bado MJ. Importance of a correct Gram Stain in Identifying Bacteria. *Rev Colegio de Microb Quím Clín de Costa Rica.* 2022;27(2).
53. López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Ortega-Peña S, Cerón-González G, Franco-Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad.* 2014;3(1).
54. Nishiyama M, Osawa K, Nakamura A, Kawakami T, Chonan M, Misawa S, et al. The 24-h reporting of Gram stains from positive blood cultures contributes to physician's use of appropriate antimicrobials: Experience at a university hospital. *Journal of Infection and Chemotherapy.* el 1 de junio de 2022;28(6):836–9.
55. Ricciardi A, Ianniello RG, Parente E, Zotta T. Factors affecting gene expression and activity of heme- and manganese-dependent catalases in *Lactobacillus casei* strains. *Int J Food Microbiol.* el 2 de septiembre de 2018;280:66–77.

56. Rodríguez López CM, Guzmán Beltrán AM, Lara Morales MC, Castillo E, Brandao PFB. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* spp. (Lactobacillaceae) resistentes a Cd(II) y As(III) recuperados de fermento de cacao. *Acta Biolo Colomb.* el 1 de enero de 2021;26(1):19–29.
57. Velasquez-Tellez J.A., Giraldo-Giraldo G., Padilla-Sanabria L., Giraldo-Castaño Y.M. Crecimiento de *Lactobacillus casei* ssp *casei* ATCC 393 en suero clarificado. *Biotechnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial.* 2015;13(1):19–27.
58. Ossa JA, Vanegas MC, Badillo ÁM. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* *tobacillus plantarum*. *UDCA Act & Div Cient.* 2010;13(1):97–104.
59. Velkushanova K, Strande L, Ronteltap M, Koottatep T, Brdjanovic D, Buckley C. *Methods for Faecal Sludge Analysis.* Velkushanova K, Strande L, Ronteltap M, Koottatep T, Brdjanovic D, Buckley C, editores. *Methods for Faecal Sludge Analysis.* IWA Publishing; 2021.
60. Wang S, Liu X, Tamura T, Kyouno N, Zhang H, Chen JY. Effect of volatile compounds on the quality of miso (traditional Japanese fermented soybean paste). *LWT.* el 1 de marzo de 2021;139:110573.
61. Bleuler M, Gold M, Strande L, Schönborn A. Pyrolysis of Dry Toilet Substrate as a Means of Nutrient Recycling in Agricultural Systems: Potential Risks and Benefits. *Waste Biomass Valorization.* el 1 de julio de 2021;12(7):4171–83.

62. Englund M, Carbajal JP, Ferré A, Bassan M, Hoai Vu AT, Nguyen VA, et al. Modelling quantities and qualities (Q&Q) of faecal sludge in Hanoi, Vietnam and Kampala, Uganda for improved management solutions. *J Environ Manage.* el 1 de mayo de 2020;261:110202.
63. Jozala DR, Oliveira IS de F, Ortolan EVP, Oliveira Junior WE de, Comes GT, Cassettari VMG, et al. Brazilian Portuguese translation, cross-cultural adaptation and reproducibility assessment of the modified Bristol Stool Form Scale for children. *Jornal de Pediatria (Versão em Português).* el 1 de mayo de 2019;95(3):321–7.
64. Chaisu K, Charles AL, Guu YK, Yen TB, Chiu CH. Optimization Lactic Acid Production from Molasses Renewable Raw Material through Response Surface Methodology with *Lactobacillus Casei* M-15. *APCBEE Procedia.* 2014;8:194–8.
65. Madigan M. T. Bender K. S. Buckley D. H. Sattley W. M. & Stahl D. A. *Brock Biology of Microorganisms.* 15a ed. New York: Pearson ; 2018.
66. Mamera M, van Tol JJ, Aghoghovwia MP. Treatment of faecal sludge and sewage effluent by pinewood biochar to reduce wastewater bacteria and inorganic contaminants leaching. *Water Res.* el 1 de agosto de 2022;221:118775.